



Università di Pisa
Dipartimento di Scienze Veterinarie
Tesi Magistrale in Medicina Veterinaria

**Immunolocalizzazione delle cellule del sistema
immunitario in camosci affetti da rogna sarcoptica, altre
parassitosi cutanee e soggetti di controllo.**

Tesi Magistrale di: Camilla Lazzarotti

Relatore:

Prof. Alessandro Poli

Controrelatore:

Prof.ssa Francesca Abramo

Correlatore:

Dott. Roberto Papini

ANNO ACCADEMICO: 2014 - 2015

A Lola e Valentina

RIASSUNTO

Il camoscio (*Rupicapra rupicaprae*) è un ruminante selvatico tipico delle zone di alta montagna, appartenente alla Famiglia dei Bovidi, Sottofamiglia Caprinae. La rogna sarcoptica del camoscio è una malattia parassitaria sostenuta dall'acaro *Sarcoptes scabiei* var. *rupicaprae* e rappresenta una delle più gravi patologie di tale specie.

Oggetto della presente tesi è stato l'immunolocalizzazione delle cellule del sistema immunitario nei principali organi linfoidi del camoscio. In particolare, è stata valutata la reattività di anticorpi anti-CD3, CD4, CD8, CD21, CD79 α , CD68 e Foxp3 nei confronti delle cellule immunitarie di camoscio in linfonodi e milza, utilizzando due diversi metodi di fissazione.

Successivamente sono state studiate le lesioni cutanee di camosci provenienti dagli areali di Belluno, Lecco e Val D'Ossola individuando due gruppi di animali: camosci con rogna sarcoptica (con diversa gravità di lesioni), camosci affetti da altra ectoparassitosi; un terzo gruppo era costituito da animali non affetti da parassitosi cutanee scelti come soggetti di controllo. Con i protocolli di immunoistochimica, precedentemente testati, è stata valutata la risposta immunitaria a livello cutaneo dei camosci dei tre diversi gruppi di soggetti.

La distribuzione delle cellule immunitarie negli organi linfoidi di camoscio è risultata analoga a quella riscontrata in altri ruminanti domestici e selvatici. La fissazione in sali di zinco ha permesso di identificare un maggior numero di epitopi cellulari. Infatti cellule CD21⁺ e CD4⁺ sono risultate rilevabili solo in tessuti fissati in sali di zinco, come pure una percentuale maggiore di cellule CD68⁺.

Le indagini condotte per caratterizzare le lesioni dermatopatologiche hanno rilevato come le lesioni cutanee (croste e alopecia) siano più gravi negli animali affetti da rogna sarcoptica rispetto a quelli affetti da altra parassitosi, così come il numero di acari è significativamente maggiore in tali soggetti. In

entrambe le parassitosi si rileva la presenza di eosinofilia e linfocitosi cutanea. In particolare, nei soggetti affetti da rogna sarcoptica, si osservano percentuali più alte di linfociti T CD3⁺ e macrofagi, mentre nelle altra parassitosi si rileva una percentuale più alta di linfociti B CD79⁺.

Tra i camosci affetti da rogna sarcoptica non sono state osservate importanti differenze nella distribuzione percentuale delle diverse cellule infiammatorie in animali con lesioni cutanee di gravità diversa.

ABSTRACT

Alpine chamois (*Rupicapra rupicaprae*) is a wild ruminant belong to Bovidae family, subfamily Caprinae that lives in high mountain habitats. Sarcoptic mange caused by *Sarcoptes scabiei* var. *rupicaprae* is a severe disease that can this species.

The aim of this study was to identify and immunolocalize different chamois immune cell subtypes in lymph nodes and spleen with using antibodies against CD3, CD4, CD8, CD21, CD79 α , CD68 e Foxp3 epitopes on tissue fixed both with formalin and zinc salts fixatives. Moreover, cutaneous lesions have been studied in chamois from different regions of Italian Alps. Particularly, three groups of animals have been identified: animals with sarcoptic mange (with different severity of lesions), animals with other cutaneous parasitic infection, and healthy animals. With the previously tested immunohistochemical techniques, inflammatory infiltrates have been evaluated in all animals of these three groups.

The reactivity and distribution of immune cells in lymph nodes and spleen were similar to those described in other domestic and wild ruminants. Zinc salts fixative allowed a wider detection of cell surface epitopes. Indeed, the specific labelling of CD4 and CD21-positive cells were retrieved only in ZSF tissues and higher percentages of CD68-positive cells were detected on zinc salts fixed tissues.

Cutaneous lesions (crusts and alopecia) and the number of mites were more severe and numerous in sarcoptic mange-infected chamois than in

subjects with other parasitic infection. High percentages of lymphocytes and eosinophils were presents in the dermis of animals with sarcoptic mange and animals with other parasite. In sarcoptic mange animals, higher percentages of CD3-positive lymphocytes were present, whereas in other parasite diseases high percentages of CD79-positive lymphocytes were observed. No significant differences in the percentage of inflammatory cells were detected in sarcoptic mange-affected subjects with different grading of cutaneous lesions.

INDICE

1. INTRODUZIONE	8
1.1 CLASSIFICAZIONE E BIOLOGIA DEL CAMOSCIO	8
1.1.1 <i>Tassonomia</i>	8
1.1.2 <i>Distribuzione geografica (Figura 1)</i>	10
1.1.3 <i>Distribuzione ecologica</i>	12
1.1.4 <i>Biologia del Camoscio</i>	13
2 PRINCIPALI PATOLOGIE DEL CAMOSCIO ALPINO	18
2.1 PATOLOGIE AD EZIOLOGIA VIRALE	18
2.2 PATOLOGIE AD EZIOLOGIA BATTERICA:	18
2.3 PATOLOGIE AD EZIOLOGIA MICOTICA:	19
2.4 PATOLOGIE AD EZIOLOGIA PARASSITARIA	19
3 INFESTAZIONE DA ROGNA SARCOPTICA.....	20
3.1 GENERALITÀ, CLASSIFICAZIONE E BIOLOGIA DI <i>SARCOPTES SCABIEI</i>	20
3.2 SINTOMATOLOGIA CLINICA	27
3.3 DISTRIBUZIONE EPIDEMIOLOGICA DELLA ROGNA SARCOPTICA.....	28
3.4 EVOLUZIONE DELL'EPIDEMIA TRA IL 1995 E MAGGIO 2006.....	29
3.5 LA RISPOSTA IMMUNITARIA DEL CAMOSCIO NEI CONFRONTI DI <i>SARCOPTES</i>	31
4 LOCALIZZAZIONE E DISTRIBUZIONE DELLE CELLULE DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEI PRINCIPALI ORGANI LINFOLDI.....	35
4.1 LINFONODI.....	35
4.2 MILZA	38
5 MATERIALI E METODI	43
5.1 ANIMALI	43
5.2 FASI DELLO STUDIO	44
5.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	49
5.3.1 <i>Preparazione dei campioni di milza e linfonodo</i>	49
5.3.2 <i>Preparazione dei campioni di tessuti cutanei</i>	49
5.3.2.1 <i>Score per la valutazione dello stato cellulare delle lesioni cutanee</i>	49
5.4 CONTEGGIO CELLULARE	55
5.4.1 <i>Conteggio cellulare per linfonodi e milza</i>	55
5.5 CONTEGGIO CELLULARE PER I TESSUTI CUTANEI.....	56
5.6 ANALISI STATISTICA.....	56
5.6.1 <i>Analisi statistica linfonodi e milza</i>	56
6 RISULTATI FASE 1	58
6.1 ANALISI LINFONODO	58
6.2 ANALISI DELLA MILZA	61
6.3 DISTRIBUZIONE CELLULARE A LIVELLO DI LINFONODO E MILZA	65
6.3.1 <i>CD3</i>	65
6.3.2 <i>CD79</i>	67
6.3.3 <i>CD68</i>	68
6.3.4 <i>CD4</i>	69
6.3.5 <i>CD21</i>	70
6.3.6 <i>CD8 e TCR$\gamma\delta$</i>	70
6.3.7 <i>T-reg Foxp3⁺</i>	70
7 CONCLUSIONI FASE 1	71

8	RISULTATI FASE 2	76
8.1	ATTRIBUZIONE SCORE	76
8.2	ANALISI DEI PARAMETRI DERMATOPATOLOGICI NEI GRUPPI DI CAMOSCI ESAMINATI	79
8.3	ANALISI DELLE COMPONENTI CELLULARI NELLE TRE POPOLAZIONI ESAMINATE.....	80
8.3.1	<i>Animali parassitati (Rogna sarcoptica e altra parassitosi) e animali sani.....</i>	<i>82</i>
8.3.2	<i>Animali affetti da rogna sarcoptica e soggetti con altra parassitosi</i>	<i>84</i>
8.3.3	<i>Confronto per grading di crosta tra animali affetti da rogna sarcoptica e animali affetti da altra parassitosi</i>	<i>84</i>
8.3.4	<i>Confronto tra le popolazioni cellulari in camosci affetti da rogna sarcoptica suddivisi sulla base della gravità delle lesioni (score croste).....</i>	<i>86</i>
9	CONCLUSIONI FASE 2	88
10	BIBLIOGRAFIA	91
11	- RINGRAZIAMENTI	101

1. INTRODUZIONE

1.1 Classificazione e biologia del camoscio

1.1.1 Tassonomia

Il termine camoscio ha derivazione etimologica dalla parola greca "χέμσος" (pr. kemas), che indica - una capra selvatica abbastanza simile al camoscio. χέμσος - a sua volta deriva dalla radice sanscrita "camp" o "kamp" (muoversi, saltellare, balzare). Ne seguì in latino: "camutium" (basso latino); "camoccia" (medioevo); "chamossius" (Savoia, XIV sec.); "chamossus" (Delfinato, XII sec.).

L' inquadramento tassonomico del camoscio, secondo *Mustoni et al* (2002), si sviluppa nel seguente modo

CLASSE	Mammalia
Superordine	Ungulata
ORDINE	Artiodactyla
Sottordine	Ruminantia
FAMIGLIA	Bovidae
Sottofamiglia	Caprinae
TRIBÚ	Rupicaprini
GENERE	Rupicapra
SPECIE	SOTTOSPECIE
<i>R. pyrenaica</i>	<i>R. p. ornata</i> (Neumann, 1899) – Camoscio d'Abruzzo <i>R. p. parva</i> (Cabrera, 1911) <i>R. p. pyrenaica</i> (Bonaparte, 1845)
<i>R. rupicapra</i>	<i>R. r. asiatica</i> (Lydekker, 1908) <i>R. r. balcanica</i> (Bolkay, 1925) <i>R. r. carpatica</i> (Couturier, 1938) <i>R. r. cartusiana</i> (Couturier, 1938) <i>R. r. caucasica</i> (Lydekker, 1910) <i>R. r. rupicapra</i> (Linnaeus, 1758) – Camoscio alpino <i>R. r. tatraica</i> (Blahout, 1971)

Il camoscio è un mammifero tipico delle zone di alta montagna, appartenente al superordine degli Ungulati, dal latino “*ungulatum*”, ossia “provvisto di unghie”, intese come zoccoli. Caratteristica degli ungulati è quella di poggiare il peso corporeo interamente sulla punta delle dita, per questo le unghie si sono sviluppate a guisa di zoccolo per impedirne l’usura. Facendo parte dell’ordine degli *Artiodactyla*, il camoscio si caratterizza per avere un numero pari di dita e gli arti sorretti in egual misura dal terzo e quarto dito.

La tassonomia del camoscio ha subito recentemente alcune revisioni. Fino alla metà degli anni ottanta si pensava che il genere *Rupicapra* possedesse un’unica specie sulla base dei dati morfologici e dei reperti fossili riscontrati fino ad all’ora (*Lydekker 1913; Couturier 1938; Dolan 1963*). La specie in questione era *R. rupicapra*, suddivisa a sua volta in dieci sottospecie, sulla base delle aree geografiche di provenienza. Negli anni successivi furono eseguite analisi più approfondite per quanto concerne le caratteristiche morfologiche (*Lovari & Scala 1980; Lovari 1987; Masini & Lovari 1988*), etologiche (*Lovari 1985*) e genetiche (*Nascetti et al. 1985*) del genere *Rupicapra* che ebbero come risultato l’identificazione di due specie diverse: *R. rupicapra* e *R. pyrenaica*.

La distribuzione geografica delle due specie è ben definita, *R. rupicapra* si riscontra prevalentemente in tutta l’Europa centro-orientale ed è suddivisa a sua volta in 7 sottospecie, come indicato nella tassonomia sopra riportata, mentre *R. pyrenaica* è localizzata esclusivamente sulla catena dei Pirenei e in centro Italia ed è suddivisa in tre sottospecie. Queste distinzioni sono state recentemente confermate da studi basati su marcatori genetici molecolari (microsatelliti, d-loop, ecc.).

Negli ultimi anni si è sviluppata l’idea, basandosi anche su dati genetici (*Pérez et al. 2002*), che l’alta differenziazione morfologica riscontrata in *R. pyrenaica ornata* (il camoscio d’Abruzzo) possa essere ricondotta ad uno status di nuova specie: il camoscio Appenninico. Questa differenziazione potrebbe essere dovuta al forte isolamento geografico che caratterizza questa popolazione del centro Italia da lungo tempo. Alle stesse conclusioni arriva

anche un lavoro recente che analizza delle popolazioni di camoscio provenienti da diverse regioni europee, tra cui alcuni campioni di *R. pyrenaica ornata*. Dallo studio si evince che sarebbero presenti tre linee evolutive differenti nel genere *Rupicapra*: quella del camoscio nord-orientale, quella sud-occidentale e una linea indipendente per *R. pyrenaica ornata* (Crestanello 2002-2004).

1.1.2 Distribuzione geografica (Figura 1)

L'origine zoogeografica del genere *Rupicapra* e dei suoi diretti precursori, si colloca con probabilità in Asia sud-occidentale da dove si diffuse poi verso occidente lungo le catene montuose del sistema asiatico nel Pleistocene medio-inferiore. I primi fossili di *Rupicapra* comparvero improvvisamente nel Pleistocene medio (500.000 anni fa) in Francia, ma i Rupicaprini esistevano già nel Miocene (oltre 5-7 milioni di anni fa). La sottospecie *R.r.rupicapra* è presente come forma autoctona nelle Alpi francesi, italiane, svizzere, austriache, nel Liechtenstein, nel Giura svizzero e francese, in Germania (Alpi bavaresi), in Slovenia e Croazia nord-occidentale, nonché per effetto di immissioni, sui piccoli Tatra (Slovacchia), sui monti della Repubblica Ceca, nei Vosgi e nel Massiccio della Chartreuse (Francia) ed in numerose regioni della Germania (Foresta Nera, Valle del Neckar, alta Valle de Danubio e Suebian Jurassic, foresta di Weissenburg e montagne dell'Elbsandstein). Per effetto di immissioni agli inizi del '900 con soggetti provenienti dalle Alpi, il Camoscio è inoltre diffuso in Nuova Zelanda, con oltre 30.000 capi (Mustoni et al, 2002; Carnevali et al).

Il genere *Rupicapra* è attualmente presente nelle aree montane dell'Europa occidentale, centrale e dell'Asia Minore, con una distribuzione disomogenea in relazione ai principali rilievi montuosi, risultato della diffusione naturale e, in parte, di immissioni effettuate dall'uomo . In Italia il camoscio alpino è oggi diffuso su tutta la catena delle Alpi italiane dal Friuli Venezia Giulia alla Liguria, sebbene con differenti densità. Presenze sporadiche per dispersione dalle aree limitrofe sono segnalate in provincia di Savona, limite sud occidentale dell'areale. La specie è presente in tutte le province del tutto, o in

parte inserite nell'area alpina, da Udine a Imperia. Un piccolo nucleo è anche presente in provincia di Trieste, nei pressi di Duino, in una zona a poche centinaia di metri dal mare. Inoltre, con consistenze minime (<200 individui), la specie è presente a Treviso dove è stata completata con successo un'operazione di reintroduzione nell'area del Monte Grappa. Nelle provincie di Varese e Biella le consistenze non superano ancora i 500 individui, ma la porzione di area alpina di entrambe le provincie è molto ridotta (Carnevali et al, 2001-2005).

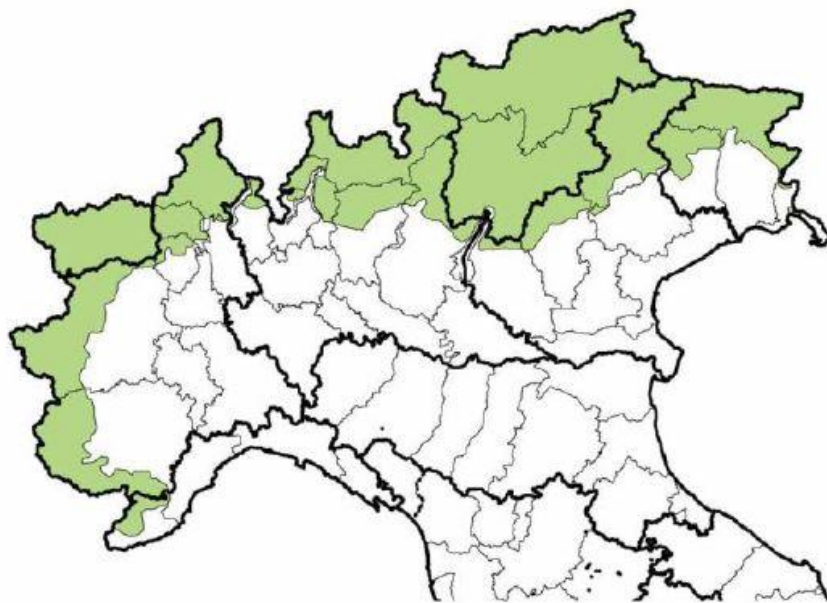


Figura 1 - Distribuzione del Camoscio Alpino aggiornata al 2006
(Carnevali et al. 2006)

Le consistenze e le densità appaiono però estremamente eterogenee a seconda della zona geografica considerata. L'estensione dell'areale distributivo ammonta comunque a 41.130 Km².

Il camoscio era molto diffuso su tutto l'arco alpino fino alla seconda metà del 1700; ebbe poi un notevole calo e, solo dopo la Seconda Guerra Mondiale, si espanse nuovamente per raggiungere l'attuale consistenza, ma si pensa che questo fenomeno di generale espansione non sia ancora terminato. Al progressivo miglioramento dello status di questi animali ha contribuito in

maniera determinante la creazione di parchi e di altri istituti di protezione che hanno favorito un più rapido incremento e stabilizzazione dei nuclei presenti. Una raccolta e sintesi di informazioni sullo status del camoscio alpino è stata condotta dall' "Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica" che ha preso in considerazione anche le popolazioni presenti all'interno delle aree protette e nelle zone precluse all'attività venatoria.

Il numero di esemplari attualmente presente sull'arco alpino è pari a circa 137.000, con un incremento dell'11% rispetto a quanto rilevato nel 2000, dovuto principalmente dalla crescita delle popolazioni nella parte occidentale dell'arco alpino. La specie si distribuisce con densità (riferite all'estensione delle sole aree ritenute idonee alla presenza del Camoscio per ciascuna provincia) comprese fra un minimo di 1,3 capi/km² in provincia di Brescia ed un massimo di oltre 10 capi/ km² in provincia di Lecco.

Nei Parchi e nelle Aziende faunistico venatorie vivono circa 20.000 individui, pari al 16% dell'intera popolazione italiana. Le consistenze più elevate si registrano nelle province autonome di Trento e Bolzano e in Piemonte, nei cui territori risulta al momento presente il 62% dei camosci alpini italiani. I contingenti più numerosi sono presenti nelle province di Trento e Bolzano (23.000 ciascuna), Belluno, Cuneo, Torino e Aosta (dai 9.000 ai 12.000) e Sondrio (8.500) (*Mustoni et al. 2003*).

1.1.3 Distribuzione ecologica

Tipico abitante dell'orizzonte montano, subalpino ed alpino, il Camoscio frequenta le aree forestali di conifere e latifoglie ricche di sottobosco ed intervallate da pareti rocciose e scoscese, radure e canali, i cespuglietti ad Ontano verde e Rododendro, con alberi sparsi di Larice, le boscaglie a Pino mugo, le praterie, i margini delle pietraie, e soprattutto, le cenge erbose al di sopra dei limiti della vegetazione arborea, sino all'orizzonte nivale. In estate le femmine ed i giovani si tengono normalmente al di sopra del bosco, mentre i maschi adulti, tendenzialmente più solitari e dispersi sul territorio, occupano mediamente quote meno elevate; durante l'inverno i camosci si ritirano verso

zone rocciose situate al di sotto dei limiti del bosco ovvero sui pendii più ripidi e le creste ventose, con esposizioni prevalentemente meridionali. Le aree frequentate risultano in genere comprese tra i 1.000 e 2.500 m di altezza, ma colonizzazioni spontanee di aree boscate di bassa montagna, sino a livelli altitudinali di 400-500 m, sono note anche in Italia. (*Spagnesi e De Marinis*)

1.1.4 Biologia del Camoscio



Figura 2 – Camosci, *Rupicapra rupicaprae*

Come si evince dalla tassonomia, appartenendo alla sottofamiglia “caprinae”, il Camoscio (**Figura 2**) assomiglia molto, anatomicamente parlando, alla nostra capra domestica. Le dimensioni corporee sono comprese in un intervallo di 110-135 cm per la lunghezza testa-groppa, 70-80 cm per l'altezza al garrese, 22-30 cm per l'altezza media delle corna e 9-15 cm la coda. È considerato, rispetto agli altri ungulati, un animale di media taglia. Il peso corporeo varia a seconda del sesso, ed è di circa 30-45 kg nel maschio e 25-35 kg nella femmina. La sua longevità è di circa 20-25 anni, raramente però raggiunge questa età, le femmine generalmente vivono circa 15-18 anni e i maschi 9-10. La differenza di longevità legata al sesso, a sfavore dei maschi, è imputabile al forte affaticamento nel periodo riproduttivo che rende i maschi più vulnerabili

alle insidie invernali. Elementi comuni per il non raggiungimento dell'età massima sono determinati inoltre dall'intensa attività venatoria e dalle difficili condizioni di vita cui sono esposti.

La struttura corporea del camoscio risulta compatta, con zampe lunghe e forti, caratteristiche necessarie per il tipo di habitat in cui risiede, nonostante ciò, si presenta come un animale dalla spiccata agilità.

Colore del mantello.

Il mantello viene cambiato due volte l'anno con lente e graduali mute. Il manto estivo, della durata di circa 3 mesi e mezzo, varia dal giallastro pallido al grigio rossastro, con arti più scuri e mascherina facciale brunastra formata da due bande nere che dalla zona nasale risalgono verso le orecchie passando sopra gli occhi e che contrastano in modo spiccato sul bianco delle guance, della gola e della parte centrale del muso, caratteristica, inoltre, la presenza di una striscia nera lungo la spina dorsale. Da metà agosto iniziano a scuirsi le parti ventrali, poi la testa, il collo e le parti dorsali. In autunno si verifica la prima muta che modifica, in previsione del freddo invernale, colore e lunghezza del pelo.

Il manto invernale, della durata di circa 8 mesi e mezzo, osservabile da ottobre in poi, è bruno o nero, caratterizzato da lunghi e dritti peli scuri e da sottili peli di lana, che contribuiscono all'isolamento termico durante i periodi più rigidi. Verso la fine dell'inverno inizia la muta con il mantello che cade lentamente e a ciuffi.

Zampe

Nel camoscio lo zoccolo è dotato di un tallone morbido, che favorisce il *grip* sulla roccia, di un bordo duro che permette lo spostamento su ripidi versanti e di una membrana, che distendendosi a ponte fra i due unghioni divaricati, permette una maggior superficie di appoggio su superfici morbide

innevate. Gli arti hanno una struttura ideale per lo scatto e per la corsa. Si dimostra inoltre essere un abile arrampicatore.

Corna.

Il trofeo presenta due astucci cornei ad uncino, con differenze nei due sessi. Il colore varia da bruno scuro a nero. Si allunga ogni anno grazie alla produzione di nuovo tessuto corneo a partire dalla base degli astucci, che si arresta in corrispondenza dell'attività sessuale (autunno) per azione contrastante degli ormoni prodotti dalle gonadi. L'arresto e la successiva ripresa della produzione di tessuto sono all'origine della comparsa di solchi, detti anelli di crescita, sfruttabili per la determinazione dell'età dell'animale. La crescita delle corna non è omogenea durante la vita dell'animale ma si sviluppa soprattutto nel 2° e 3° anno di vita, successivamente, la crescita diventa millimetrica.

<http://natura.provincia.cuneo.it/fauna/mammiferi/camoscio.jsp>

Comportamento.

Il camoscio è una specie sociale. Il nucleo principale è formato dalla femmina e dal piccolo (che rimane con la madre fino a due anni di età) che si accompagnano, generalmente, con il giovane dell'anno precedente. Più nuclei possono aggregarsi costituendo gruppi numerosi. I maschi adulti tendono ad isolarsi, o formare gruppi di età simile, mentre, nei periodo degli amori, tendono a riunirsi con le femmine. La comunicazione sociale tra i camosci avviene mediante segnali di tipo visivo. Questo animale è dotato di una buona vista anche se non particolarmente acuta, la visione binoculare (quella tridimensionale) sembra essere ristretta ad un campo di circa 45°. Il riconoscimento tra partner secondo le classi sociali, avviene grazie alla valutazione visiva di alcune caratteristiche riguardo il colore e la struttura del corpo e della testa. Anche l'olfatto ha un ruolo molto importante nelle interazioni sociali e nella difesa dai predatori. L'udito è discreto e i padiglioni auricolari, molto mobili, favoriscono la percezione dei suoni. Le femmine e i

piccoli emettono una specie di belato, mentre i maschi nella stagione riproduttiva emettono un suono rauco gutturale.

La vita di relazione del camoscio è influenzata in gran parte dal grado di maturazione sociale dell'individuo. Gli animali vengono distinti in capretti (fino al compimento di un anno), giovani o "yearlings" (maschi di 1-2 anni, femmine di un anno), subadulti (maschi di 3-4 anni, femmine di 2-3 anni), adulti (maschi di 5-9 anni, femmine di 4-11 anni) e anziani (maschi di 10 o più anni e femmine con 12 o più anni). I maschi adulti hanno sagoma tozza, collo corto e tozzo, sulla linea dorsale hanno lunghi peli, presentano "il pennello" ovvero un ciuffo di peli prepuziali visibile a partire dall'età di tre anni. Le corna sono più robuste e di maggior diametro rispetto a quelle delle femmine e maggiormente uncinata. Le femmine hanno sagoma più fine, collo sottile e corna di minor diametro, maggior sviluppo dell'addome. Gli yearlings sono i giovani al secondo anno di vita, hanno taglia intermedia, torace poco profondo, muso corto, corna di altezza uguale o inferiore alle orecchie. I capretti sono i giovani dell'anno, hanno corna appena visibili, muso molto corto e possiedono uno stretto legame con la madre.

Il periodo degli amori inizia a Novembre per concludersi verso la metà di Dicembre, con un picco dell'attività riproduttiva verso il 20-30 Novembre. I maschi territoriali difendono piccole aree da cui cacciano tutti gli altri maschi adulti e subadulti nel tentativo di mantenere e formare un gruppo di femmine attraverso comportamenti ritualizzati. Al termine della stagione riproduttiva gli animali si spostano verso le zone di svernamento dove permangono fino alla primavera (Figura 3)

La gestazione dura circa 24-25 settimane (6 mesi circa). I parti sono concentrati nel periodo che va da Maggio ai primi giorni di Giugno. Normalmente viene partorito un solo capretto, eccezionalmente due. L'allattamento si protrae con regolarità per circa 2-3 mesi (fino a 6), ma già a 20-30 giorni il capretto comincia a brucare. Il capretto è in grado di seguire la madre immediatamente dopo il parto.

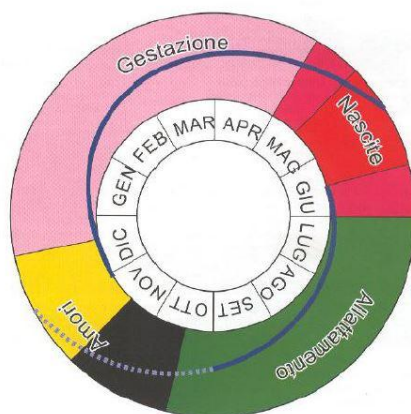


Figura 3 – Ciclo dell'attività riproduttiva del camoscio (Ingrosso S., 2008-2009)

2 PRINCIPALI PATOLOGIE DEL CAMOSCIO ALPINO

Le principali patologie del camoscio possono essere classificate in base all'agente eziologico che le determina.

2.1 Patologie ad eziologia virale

- Cheratocongiuntivite infettiva (IKC) da *Mycoplasma conjunctivae*
- Ectima contagioso da *Parapoxvirus*
- *Pestivirus*
- *Shmallenberg virus* (Chiari M et al., 2014)
- *Bluetongue virus* (Casaubon et al., 2014)
- *Papilloma virus* (RrupPVI) (Mengual-Chulià et al., 2014)
- *Virus della diarrea bovina* (Casaubon et al., 2012)

2.2 Patologie ad eziologia batterica:

- Dermatite e alopecia, *Staphylococcus aureus*;
- Pseudotubercolosi, *Corynebacterium pseudotuberculosis*;
- Brucellosi, *Brucella melitensis* biovar 3 (Mick et al., 2014);
- Pasteurellosi, *Pasteurella multocida*, *Pasteurellaceae* bronchopneumonia (*Mannheimia glucosida* and *Bibersteinia trehalosi*) (Posautz et al., 2014);
- *Arcanobacterium pyogenes*;
- Clostridiosi, *Clostridium perfringens*;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Chlamidophila pecorum*;
- *Escherichia coli*;
- Dermatite, *Dermatophilus congolensis*; (De Meneghi et al., 2002)
- *Mycoplasma conjunctivae*; Mavrot et al., 2012
- Chlamydiaceae (Holzwarth et al., 2012)
- *Salmonella enterica* serovar Abortusovis (Pioz et al., 2008)

2.3 Patologie ad eziologia micotica:

- Dermatomicosi, ossia dermatiti causate da funghi (*Dermatophilus congolensis*, *Microsporum sp.*) , di norma non pruriginose.

2.4 Patologie ad eziologia parassitaria

- Babesiosi, *Babesia capreoli* (Hoby *et al.*, 2009)
- Cisticercosi, *Cysticercus ovis*, *tenuicollis*;
- Idatidosi, *Echinococcus granulosus*;
- Distomatosi, *Fasciola hepatica*;
- Infestazione da Nematodi, *Haemonchus contortus*;
- Coccidiosi;
- Cenurosi, *Coenurus cerebralis*;
- Infestazioni da “pidocchi masticatori” che causano una dermatite pruriginosa;
- Zecche;
- Infestazioni da *Trombicula Autumnalis*
- Infestazioni da *Sarcoptes scabiei var rupicaprae*

3 INFESTAZIONE DA ROGNA SARCOPTICA



Figura 4 - *Sarcoptes scabiei* var. *rupicaprae*

3.1 Generalità, classificazione e biologia di *Sarcoptes scabiei*

Sono stati riscontrati casi di rogna in 104 specie di animali domestici, che comprendono 10 ordini e 27 famiglie, allevati all'aperto e selvatici (Pence, D.B. & E. Ueckermann. 2002).

L'epizoozia da rogna sarcoptica è determinata da *Sarcoptes scabiei* (L., 1758, Latrielle, 1802) (Acari: Astigmata, Sarcoptidae) (Figura 4), un microscopico acaro scavatore, dove maschi e femmine adulti, larve, protoninfe, tritoninfe e uova si localizzano a livello dello strato granuloso dell'epidermide.

La **rogna sarcoptica** del camoscio è una malattia parassitaria sostenuta dall'acaro *Sarcoptes scabiei* var. *rupicaprae* e rappresenta la **più grave patologia** delle popolazioni selvatiche di bovidi alpini, in particolare **camoscio** e **stambecco**, mentre solo casi sporadici si sono registrati in Italia in altre specie selvatiche (muflone e cervidi). È utile ricordare che la rogna del camoscio talvolta può determinare anche nell'uomo delle lievi reazioni cutanee pruriginose, che, tuttavia, si risolvono spontaneamente (Menzano A., 2014).

Morfologia

Non ci sono indicazioni definitive per distinguere tassonomicamente, a livello morfologico, le varie specie di *Sarcoptes*, che manifestano un'elevata specificità per l'ospite. È stato ipotizzato che l'acaro, che provoca la rogna in animali sia domestici che selvatici, appartenga ad una singola specie altamente variabile che manifesta la sua specificità fisiologica attraverso un'ampia gamma di ospiti differenti. Quindi, *S. scabiei*, è suddiviso in varietà morfologicamente indistinguibili ma che hanno un elevato grado di specificità verso il proprio ospite e un basso grado di cross-infezione (Pence, D.B. & E. Ueckermann. 2002).

Forma adulta

S. scabiei possiede un caratteristico corpo di forma ovalare, appiattito ventralmente e convesso dorsalmente. La sua superficie (idiosoma) è ricoperta da fini striature e presenta, nella parte dorsale, robuste setole. L'acaro femmina possiede numerose spine cuticolari (Figura 5), caratteristica tassonomica importante per distinguerla dal maschio (Fain 1968; Pence et al 1975). Il maschio (213-285 μm di lunghezza e 162-210 μm di larghezza) è circa due terzi della femmina (300-504 μm di lunghezza e 234-240 μm di larghezza) (Fain 1968). In entrambi i sessi Il primo e secondo paio di zampe si estendono oltre il margine antero-laterale del corpo. Sono presenti ventose a forma di campana (caruncole) su tutta la lunghezza del corpo e pedicelli non segmentati (il pedicello e la caruncola formano il pretarso) sui pretarsi delle zampe, nei maschi e, nelle due paia anteriori, nelle femmine. Nella femmina il terzo e quarto paio di zampe terminano con una lunga setola mentre nel maschio solo il terzo. I tarsi possiedono due artigli a forma di lama. L'ano è nella porzione terminale del corpo in entrambi i sessi.

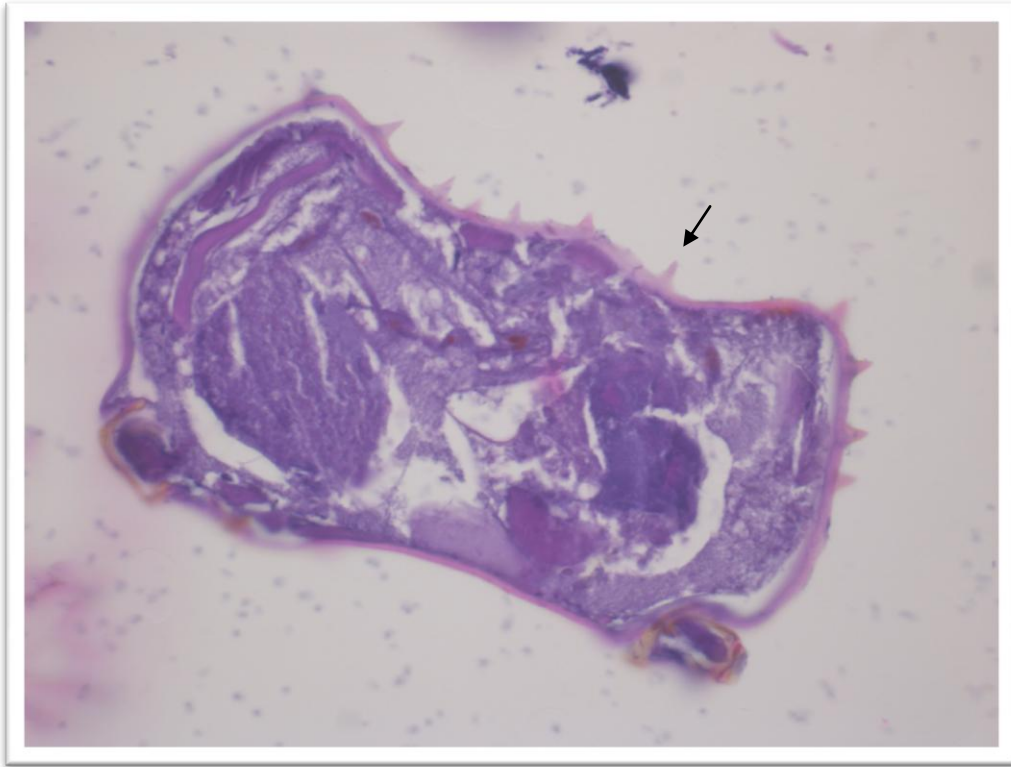


Figura 5 – Istologico di tessuto cutaneo, in evidenza acaro di *Sarcoptes* con presenza di evidenti spine cuticolari (indicate dalla freccia)

Uova

Le uova sono di forma ovalare e misurano 150–200 μm per 175–200 μm

Forma larvale (Figura 6)

Le forme larvali si distinguono in due stadi, entrambe possiedono 4 paia di zampe:

- Prima forma larvale, *protoninfa*
- Seconda forma larvale, *telo ninfa* o *trito ninfa*.

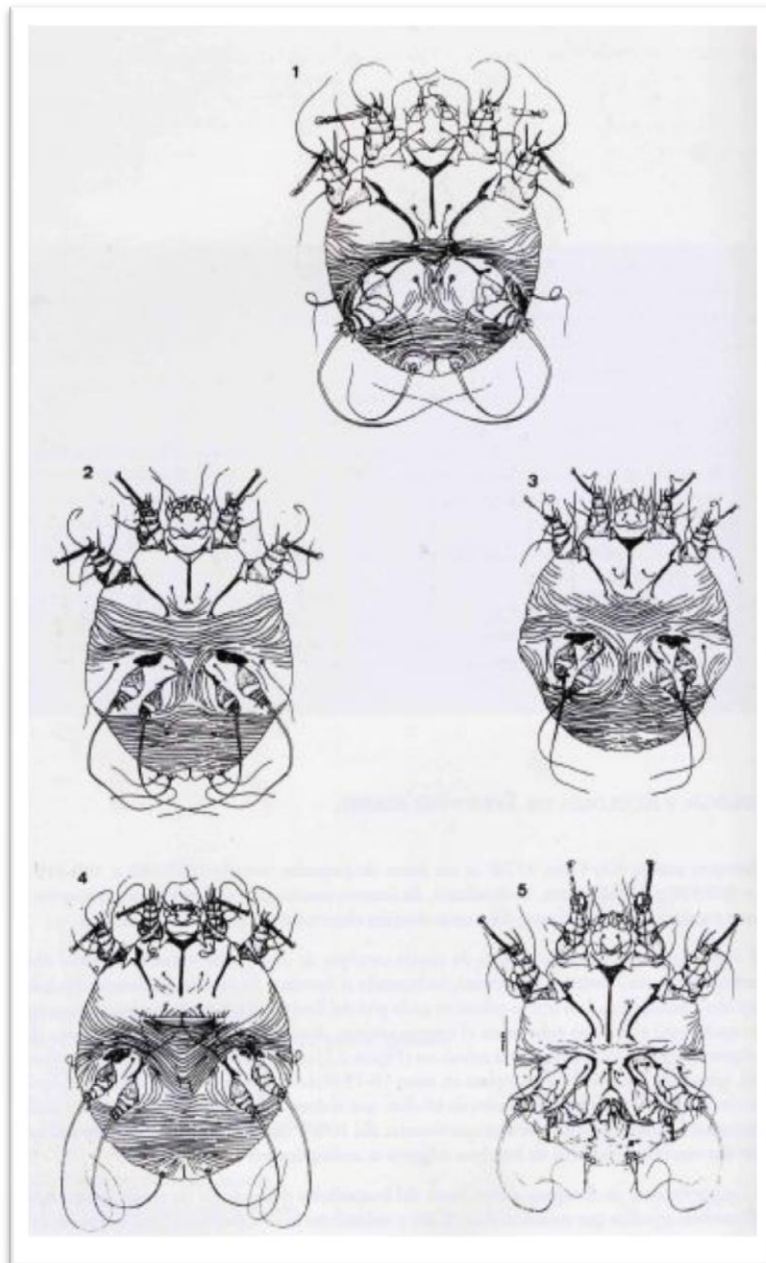


Figura 6 – Morfologia dei diversi stadi evolutivi di *S. scabiei*.

1. Larva; 2. Protoninfa; 3. Teloninfa; 4. Femmina adulta; 5. Maschio adulto

Vie di trasmissione

Gli acari della rogna sono specie-specifici, in particolare la variante che colpisce il camoscio (*S. scabiei* var *rupicaprae*) non può contagiare specie come il cinghiale o la volpe, parassitati rispettivamente da *S. scabiei* var *suis* e var *canis*.

Gli acari hanno una scarsissima capacità di resistere nell'ambiente esterno, sono molto sensibili alla disidratazione, temperature ambientali superiori a + 20

°C ne comportano la morte entro il breve arco di 24-48 ore; solo temperature medio-basse (4-10 °C) accompagnate a gradi elevati di umidità relativa (>50%), possono garantire sopravvivenze degli acari (ninfe in particolare) di poco superiori alla settimana (Arlian 1989) (Menzano A.). Si ritiene, quindi, che il contagio tra un animale e l'altro della stessa specie avvenga sempre (o quasi) per **contatto diretto** attraverso le cure parentali, gli accoppiamenti e le relazioni sociali. La trasmissione per via **indiretta**, meno frequente, a causa della scarsa sopravvivenza dell'acaro in ambiente esterno, avviene attraverso la frequentazione di luoghi comuni contaminati, quali saline e giacigli. Questa seconda modalità spiega il contagio tra specie diverse, colpiti gravemente soprattutto lo stambecco e la capra selvatica.

Ciclo biologico

S. scabiei differisce da molti altri acari della rogna, e si localizza a livello dell'epidermide dove vengono scavate gallerie a livello degli strati più esterni (Figura 7).

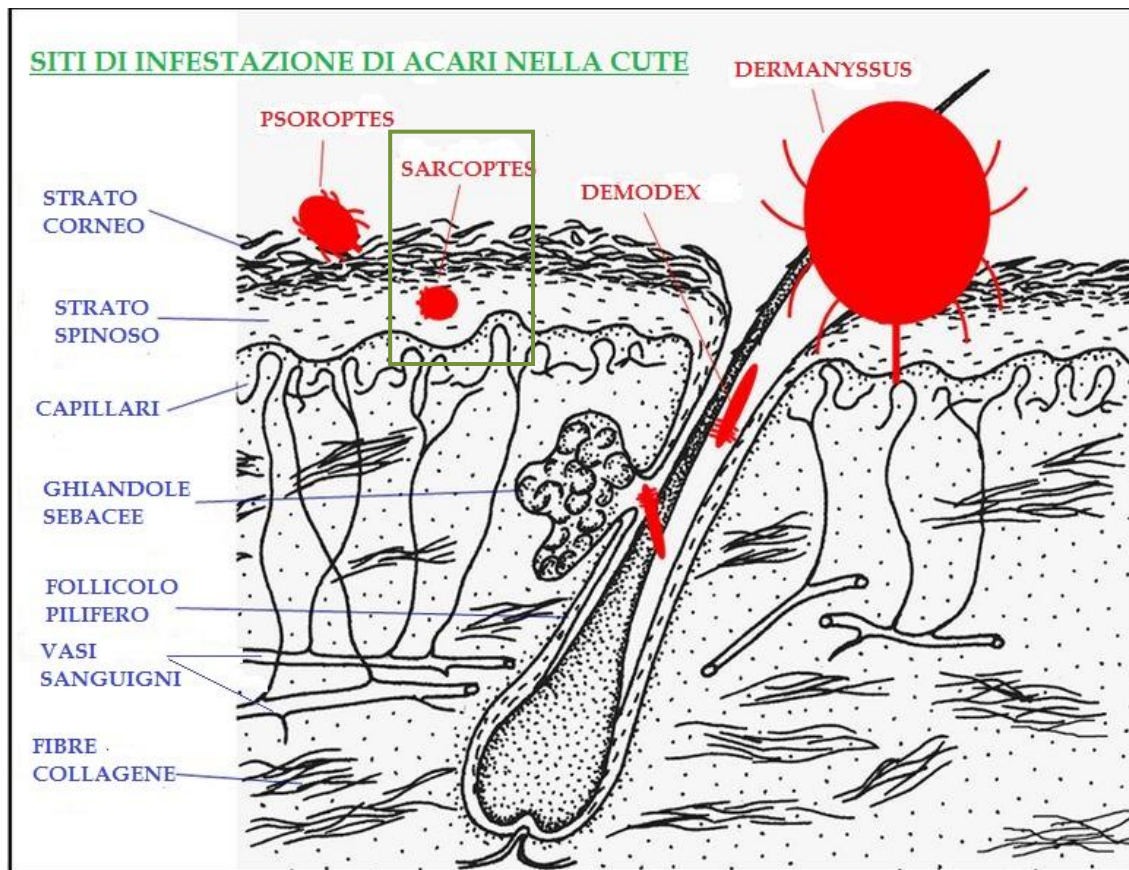


Figura 7 - Comparazione della localizzazione tra varie categorie di acari che possono presentarsi a livello cutaneo. - (Walker A. , 1994)

Tutti gli stadi del parassita possono penetrare la superficie della cute (Heilesen 1946; Mellanby 1972; Van Neste 1988). La penetrazione è coadiuvata dalla combinazione di movimenti masticatori, attraverso i cheliceri, e movimenti dello *gnathosoma* (bocca e appendici per l'alimentazione) da un lato all'altro. Gli acari scavano gallerie attraversando lo strato granuloso e spinoso, consumando le cellule e il liquido interstiziale che scorre in essi (Vane Neste 1986, 1988; Arlian et al. 1988b). A causa del continuo rinnovamento dell'epidermide, molte delle gallerie contenenti uova e feci si spostano a livello dello strato corneo (Figura 8).

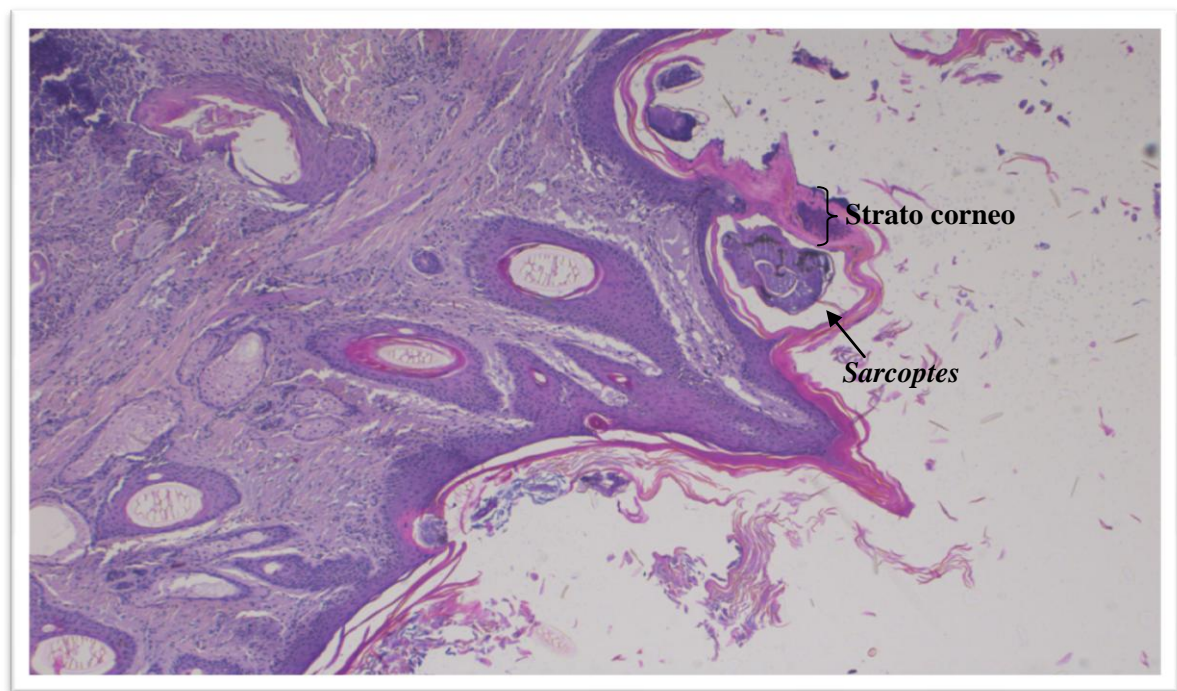


Figura 8 – Preparato istologico di tessuto cutaneo, Acaro di *S. scabiei* var. *rupicaprae* a livello dello strato corneo dell'epidermide

Le femmine fecondate, con aspettativa di vita di circa 4-6 settimane, depongono le uova in queste gallerie. In media, vengono deposte 3-4 uova al giorno da cui emergono le larve dopo 3 giorni. Alcune di queste migrano dal sito di deposizione alla cute, altre rimangono nelle gallerie dove sono state deposte o in alcune loro estensioni, denominate tasche per la muta. Qui si sviluppano nel primo stadio ninfale (protoninfa) in 3-4 giorni e nel secondo stadio larvale (tritoninfa) in circa 3 giorni. Lo stadio ninfale può rimanere nelle gallerie, nelle tasche per la muta, vagare sulla superficie cutanea o formare nuove gallerie o tasche. Sono necessari altri 3-4 giorni affinché le tritoninfe sviluppino nella forma adulta. Pertanto dalle uova alla forma adulta trascorrono circa 2 settimane (Bornstein S., Morner and Samuel). Figura 9

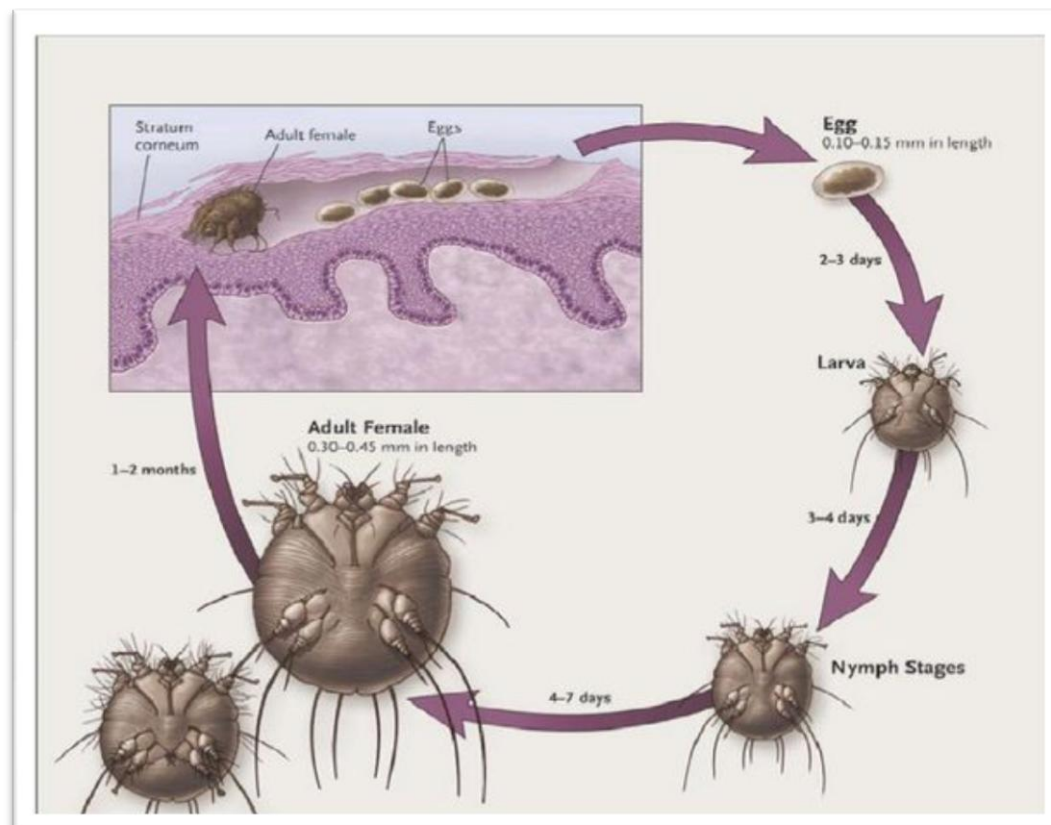


Figura 9 - Ciclo biologico di *Sarcoptes scabiei*

3.2 Sintomatologia clinica



Figura 10 - Rogna sarcoptica - Dermatite ipercheratosa crostosa

Nel camoscio, la malattia è caratterizzata da una **dermatite allergica** dovuta all'azione traumatica indotta dai parassiti e dalle sostanze rilasciate dalla femmina dell'acaro mentre scava gallerie nella cute per la deposizione delle uova. Si ha quindi la comparsa di **squame** e successivamente di **croste** su capo (Figura 10), collo, addome e zampe. Successivamente si ha la comparsa di alopecia (perdita di peli, non sempre visibile) e di lesioni crostose screpolate e maleodoranti (odore di grasso rancido) a partire dal muso e dal collo in estensione a tutto il corpo. A seguito di ciò si manifestano lesioni dermatologiche secondarie a infezioni microbiche, un calo delle difese immunitarie e un conseguente cambio del comportamento, che porta l'animale ad isolarsi e ad abbassarsi di quota. Il forte prurito costringe l'animale a continui sfregamenti che determinano la comparsa di **lesioni autotraumatiche**. Il decorso della malattia porta l'animale alla perdita dell'appetito con progressivo dimagrimento sino al decesso che sopraggiunge nel giro di 2-4 mesi. Il primo impatto della rogna sarcoptica in una popolazione di camoscio indenne determina elevati indici di mortalità che nell'arco di 3-5 anni possono ridurre la popolazione iniziale del 70-95%. Successivamente la rogna persiste nella popolazione ospite dando origine a riacutizzazioni, con periodicità di 7-15 anni e una mortalità variabile tra il 10 e il 25%. La malattia non è controllabile con i mezzi attualmente a disposizione; vanno evitati abbattimenti di capi sani o con lesioni cutanee limitate all'interno di quei nuclei che stanno già subendo perdite a causa della malattia, in modo da non rischiare di abbattere gli eventuali soggetti resistenti, dalla cui sopravvivenza dipenderà il futuro di quel nucleo.

3.3 Distribuzione epidemiologica della rogna sarcoptica

La rogna sarcoptica nel camoscio è stata documentata per la prima volta in Austria, precisamente in Stiria, nella prima metà del XIX secolo. Le lesioni descritte sui camosci all'epoca, farebbero pensare a casi di rogna. Notizie certe risalgono al 1870, quando la malattia venne riconosciuta nella Valle del Malta, in Carinzia, da dove si spostò in seguito verso Nord, andando ad interessare il

settore nord-orientale del Salisburghese. Nel 1917, secondo un rapporto dell'Imperial regio Ministero dell'Agricoltura, la rogna sarcoptica interessava l'intero Salisburghese. Nella prima metà del '900 era comunque certa la presenza di due focolai in Austria: al confine con la Baviera, nella zona di Berchtesgaden, e nella porzione occidentale delle Alpi dello Ziller. Intorno alla metà del '900, provenendo dalla Carinzia, la rogna sarcoptica fece la sua prima comparsa sulle Alpi Italiane, nel settore più orientale: nel 1949 furono colpite dalla malattia le popolazioni di camoscio del versante carnico della Val Canale, in provincia di Udine. Da qui, la rogna avanzò negli anni seguenti verso ovest, interessando dapprima il versante italiano e austriaco delle Alpi Carniche e quindi, nel 1976, provenendo sia dallo Zillertal, sia dalla zona degli Alti Tauri, il settore nord-orientale della provincia di Bolzano. Sempre nella seconda metà degli anni '70, muovendo verso sud, la rogna andò a colpire il settore settentrionale delle Alpi Giulie. Nel 1995 una nuova epidemia di rogna si è manifestata nelle Dolomiti Orientali, colpendo la riserva di caccia di Auronzo di Cadore, nel Bellunese, per andare quindi a interessare, a partire dal 1997, le zone limitrofe della provincia di Bolzano e allargarsi negli anni seguenti in direzione sud-ovest, coinvolgendo anche la provincia di Trento.

3.4 Evoluzione dell'epidemia tra il 1995 e maggio 2006

Nel 1995 e 1996 sono stati segnalati i primi capi rognosi nel gruppo delle Dolomiti di Sesto, nel territorio della provincia di Belluno, nella zona di Val di Cengia e Val Marzon. L'epidemia si è diffusa l'anno seguente, nel 1997, in territorio altoatesino, colpendo le riserve di Sesto Pusteria, San Candido e Dobbiaco e già alla fine del 1998 si è presentata nei confinanti gruppi montuosi del Cristallo e delle Marmarole e nelle Alpi Carniche.

Tra il 1999 e il 2000 l'epidemia di rogna ha investito il rimanente settore altoatesino delle Dolomiti di Sesto, causando notevoli perdite e un crollo delle popolazioni, si è registrato inoltre un notevole balzo della malattia verso ovest: nel 2000 sono infatti state colpite la zona di Livinallongo e l'Alta Val Badia.

Tra il 2001 e 2002 si è conclusa la fase epidemica nel gruppo delle Dolomiti di Sesto. Contemporaneamente, la rogna sarcoptica si è spostata in direzione sudovest e nuovi focolai sono sorti nel Parco Regionale d'Ampezzo, nel settore meridionale del gruppo delle Marmarole e nel gruppo Vial di Pan – Mignon. È stata inoltre colpita la provincia di Trento, con i primi casi nel Gruppo del Sella. Nel 2003 e 2004 si è registrato un numero decisamente elevato di perdite; sono stati quasi 800 i camosci colpiti nella zona del Parco Regole d'Ampezzo e nelle confinanti riserve della Val Badia e della Val di Braies. I due focolai principali, quello orientale delle Dolomiti di Sesto e quello occidentale nell'area Livinallongo – Alta Badia, rimasti fino ad allora distinti, si sono uniti. È stato inoltre colpito il Gruppo del Picco di Vallandro, fino a quel momento risparmiato. Particolare rilievo ha assunto infine il caso di rogna rilevato nel settore trentino del Gruppo del Catinaccio, in Val Udai, che ha segnato un ulteriore passo verso ovest della malattia. Nel corso del 2005 l'area colpita dalla rogna non si è espansa in misura sensibile. Sono tuttavia colpite in modo particolarmente violento le popolazioni di camoscio della Val Badia. Anche della zona di Picco di Vallandro si è registrato un crollo delle consistenze. Nel tardo autunno, venne abbattuto il primo camoscio rognoso anche nel Gruppo Puez – Odle. Nelle confinanti province di Trento e Belluno l'area colpita dall'epidemia ha manifestato la tendenza ad allargarsi verso sud. Nei primi mesi del 2006 la maggior parte dei casi di rogna sarcoptica sono stati registrati in Val Badia. In espansione i casi del Gruppo Puez. (Erhard H. 2006) (Figura 11)

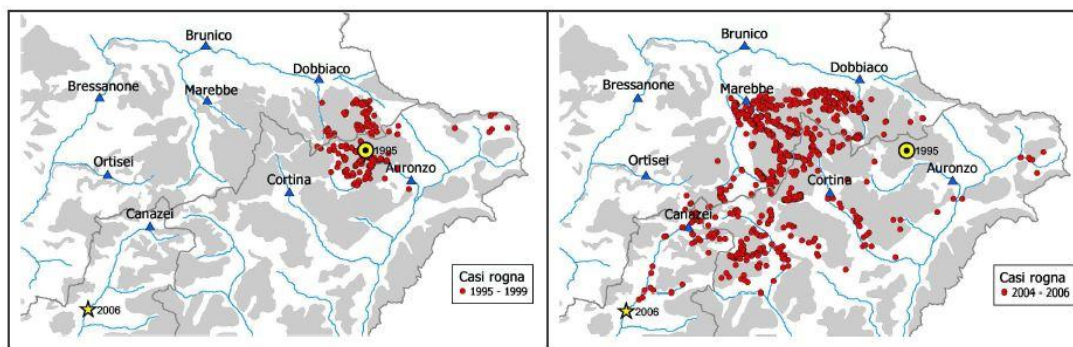


Figura 11 - Diffusione dell'epidemia dal 1995 al 2006: risulta evidente l'espansione in direzione sud-ovest, (Erard H. 2006)

Nella primavera del 2000 è stato creato un protocollo di intesa tra le Province di Bolzano e Belluno alle quali poi si sono aggiunti la Provincia di Trento, il Parco delle Regole di Ampezzo ed infine nel 2004 anche il Parco Naturale delle Dolomiti Friulane. Gli Enti firmatari si sono impegnati a scambiare con gli altri Enti tutte le informazioni relative all'andamento dell'epidemia di “rognia sarcoptica”, al fine di rendere omogenea la raccolta dei dati, confrontare le strategie di intervento e sviluppare delle analisi previsionali sui probabili corridoi di espansione della malattia.

3.5 La risposta immunitaria del Camoscio nei confronti di *Sarcoptes*

S. scabiei scava delle gallerie nella cute utilizzando i cheliceri, lo gnatosoma ed uncini taglienti presenti sugli arti (Yager & Scott 1985). Contemporaneamente rilascia delle sostanze, per ora poco conosciute, che facilitano la digestione dei tessuti dell'ospite. Nella cute vengono anche rilasciate abbondanti quantità di materiale antigenico: secreti ed escreti degli acari vivi, acari morti, gusci di uova (Pence & Ueckermann 2002). L'antigene si infila fino agli strati più profondi dell'epidermide e del derma provocando, nelle vicinanze delle lesioni, una risposta immunitaria sia di tipo umorale che cellulo-mediate (Falk & Eide 1981; Sheahan 1975). Studi istologici su cane, coniglio e uomo hanno rivelato la presenza, in corrispondenza delle lesioni da rognia, di un infiltrato cellulare misto con prevalenza di neutrofili, macrofagi, plasmacellule e altre cellule mononucleate (Falk & Eide 1981; Falk & Matre

1982; Morsy & Gaafar 1989; Sheahan 1975). Numerosi lavori hanno dimostrato che *S. scabiei* è la fonte di innumerevoli molecole dotate di proprietà antigeniche (Arlian & Morgan 2000; Arlian et al. 1991; Arlian et al. 1988). Alcune di esse sono specifiche, altre comuni con artropodi di diverso genere (Rantanen et al. 1981).

Quando un artropode si nutre su di un animale, introduce con la saliva degli antigeni stimolando una risposta immunitaria che può essere di tre tipi:

- alcuni componenti della saliva hanno un basso peso molecolare e quindi non si comportano come antigeni ma come apteni che si legano a proteine della cute. In questo modo stimolano una risposta cellulomediata; in seguito ad un secondo contatto inducono una reazione di ipersensibilità ritardata;
- altri antigeni salivari possono legarsi alle cellule di Langerhans dell'epidermide inducendo una ipersensibilità cutanea basofila, in questo caso si ha una risposta umorale associata alla produzione di IgG e ad infiltrato basofilo;
- infine si può avere una risposta caratterizzata dalla produzione di IgE e quindi una ipersensibilità di tipo I. Questa reazione può indurre una grave infiammazione cutanea locale con intenso prurito (Tizard 1992).

Attualmente poco si conosce sulla capacità e sul tipo di risposta immunitaria del camoscio verso *S. scabiei*. Forstner (1962) e Ondersheka et al. (1989) hanno condotto prove di infestazione in condizioni controllate, identificando alcune cause predisponenti della malattia. Un'alta dose infestante ed una scarsa condizione fisica possono condizionare l'evoluzione della malattia verso una forma grave e letale. In natura, tuttavia, è stato osservato come la rogna colpisca con uguale morbilità anche popolazioni che si trovano in equilibrio con l'ambiente in cui vivono, come può essere dedotto dal peso degli animali cacciati e dalle buone performance riproduttive, valutabili mediante i censimenti (Rossi et al. 1995). Secondo quanto osservato in modelli sperimentali d'infestazione nel cane, nel coniglio e nell'uomo (Arlian & Morgan 2000; Arlian et al. 1996; Arlian et al. 1995; Arlian et al. 1994; Bornstein 1991; Mellanby 1944;

Rantanen et al. 1981), un'alta percentuale di soggetti di queste specie sarebbero in grado di produrre una risposta immunitaria efficace in seguito ad un primo contatto con il parassita. Nei soggetti "resistenti" si potevano osservare: un decorso della malattia autolimitante, una comparsa anticipata delle lesioni cutanee, lesioni meno estese e meno intense ed una risposta umorale meno prolungata, meno intensa e più precoce. Differenze rilevanti, tra i soggetti resistenti e i suscettibili, sono state osservate anche a livello di infiltrato cellulare in corrispondenza delle lesioni da rogna, con variazioni nel numero e nella quantità di neutrofili, plasmacellule, macrofagi, linfociti ed eosinofili (Arlian et al. 1994; Thomson et al. 1974). Nella volpe (*V.vulpes*), al contrario, la malattia si presentava ugualmente grave, sotto il profilo clinico, tanto alla prima come alla seconda esposizione al parassita (Little et al. 1998b; Morita et al. 1998; Skerratt et al. 1999) (Menzano A.)

Studi su diverse specie animali mostrano che la risposta secondaria in ospiti sensibilizzati da una precedente esposizione o da immunizzazione con estratto di acaro della polvere si esprime con profili di risposta simili a quelli di una risposta cellulo-mediata, Th1. In uno studio sulla scabbia canina, è stato trovato che cani infestati con acari di *Sarcoptes spp.* e trattati con ivermectina sviluppano una risposta immunitaria protettiva contro il parassita, che impedisce una successiva reinfestazione. (Arlian et al. 1996). L'infiltrato cellulare nelle lesioni da scabbia durante l'infestazione iniziale mostrava la presenza di un alto livello di cellule mononucleari e mastociti caratteristico di una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata (Th1) (Stemmer et al., 1996, Arlian et al. 1997). Sulla infestazione di richiamo dopo il trattamento l'infiltrato cellulare era marcatamente aumentato, costituito prevalentemente da linfociti, monociti e neutrofili, determinato probabilmente da un segnale da parte delle Th1, attraverso la secrezione di citochine. Analisi istologiche sulle lesioni da *Sarcoptes spp.* indicano inoltre, che è presente una rapida infiltrazione (12-48 h) di Linfociti T, Cellule di Langerhans CD1a⁺ e di cellule positive per MHC di classe II. Uno studio simile sui conigli mostra che il 65% di essi, che sono stati dapprima infestati, sviluppano immunità verso gli acari (Arlian, Morgan et al

1994, Arlian, Rapp et al 1994). L'analisi del titolo delle Ig totali mostra che i conigli che sviluppano immunità verso *scabiei* hanno livelli molto più bassi di anticorpi specifici anti-*scabiei* rispetto ai conigli che non hanno una risposta immuno-protettiva. In un altro studio, sono stati immunizzati i conigli con acari della polvere *Dermatophagoides* spp. e successivamente stimolati con estratti di *scabiei* (Arlian et al , 1995). Il 70% dei conigli risultava protetto e l'aspetto istologico delle lesioni indotte da *S. scabiei* era simile a quello osservato in altri studi condotti su conigli e cani (Arlian, Morgan et al., 1994; Stemmer et al., 1996; Arlian et al., 1997). Anche in questo studio il livello di anticorpi specifici anti-*scabiei* era più basso negli animali protetti rispetto a quelli non protetti in cui l'infestazione progrediva.

Nell'insieme queste osservazioni suggeriscono una relazione tra equilibrio Th1/Th2 e una risposta protettiva o patogena verso *S. scabiei*. Questa relazione è stata investigata in uno studio murino (Lalli et al 2004) in cui topi BALB/c sono stati immunizzati con estratti di *S. scabei* (risposta primaria), oppure sono stati infestati con acari di *S. Scabiei* (risposta primaria), oppure sono stati immunizzati e successivamente infestati. E' stato osservato che l'immunizzazione con estratti di *S. scabei* induce produzione di interferone (INF- γ), indicativo di risposta Th1, sia da parte di cellule della milza che dei linfonodi. Topi infestati con *S. scabiei* mostravano un aumento di produzione di IL-4 da parte delle cellule dei linfonodi e di INF- γ da parte degli splenociti. Topi inizialmente immunizzati e successivamente infestati con gli acari mostravano un aumento di produzione di INF- γ sia da parte delle cellule dei linfonodi che della milza; tuttavia, l'incremento di produzione di INF- γ era circa la metà di quello indotto dalla sola immunizzazione. Nell'insieme i dati suggeriscono che acari vivi di *S. scabiei* producono qualcosa che inibisce la produzione di INF- γ nei linfonodi di topi immunizzati con *S. scabiei* ed inoltre linfociti splenici e dei linfonodi producono profili diversi di citochine (Peter N. Lalli, 2004).

4 LOCALIZZAZIONE E DISTRIBUZIONE DELLE CELLULE DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEI PRINCIPALI ORGANI LINFOIDI

4.1 Linfonodi

I linfonodi sono organi linfatici a forma di fagiolo presenti lungo il decorso dei vasi linfatici afferenti ed efferenti. Sull'ilo entrano o escono dall'organo arterie, vene, vasi linfatici e nervi. In superficie il linfonodo è ricoperto da una capsula connettivale. Questo rivestimento esterno è perforato da numerosi vasi linfatici afferenti. Dalla capsula si diramano verso l'interno dei piccoli setti connettivali (trabecole) che formano l'impalcatura di sostegno di questo tessuto linforeticolare. Tra le trabecole c'è un reticolo tridimensionale di fibre reticolari e cellule reticolari. Gli spazi liberi delle maglie sono riempiti da cellule basofile (linfociti, plasmacellule, macrofagi, ecc.)

La differente distribuzione delle cellule all'interno dell'organo porta ad una suddivisione dei linfonodi in tre zone: (Figura 11, Figura 12)

- 1. Zona corticale** sub capsulare esterna, ricca di linfociti B;
- 2. Zona paracorticale** ricca di linfociti T;
- 3. Zona midollare interna di tessuto linforeticolare**, ricca di plasmacellule.

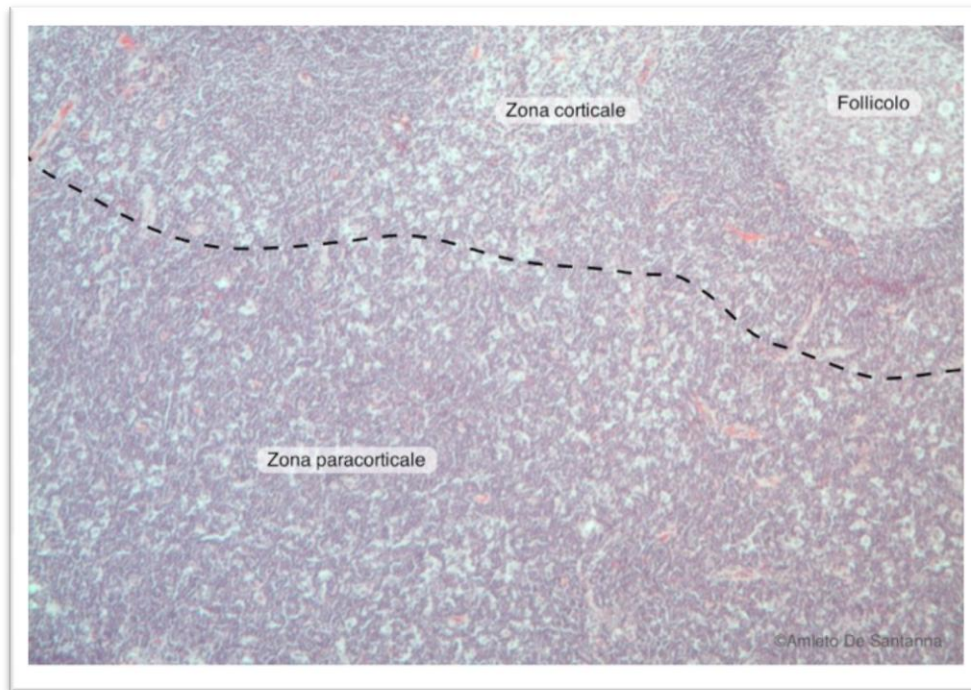


Figura 12 – Preparato istologico di Linfonodo. Demarcazione tra le Zone Corticale e Paracorticale. Nella paracorticale si possono distinguere cellule linfocitarie non organizzate in follicoli (Amleto de Santanna)

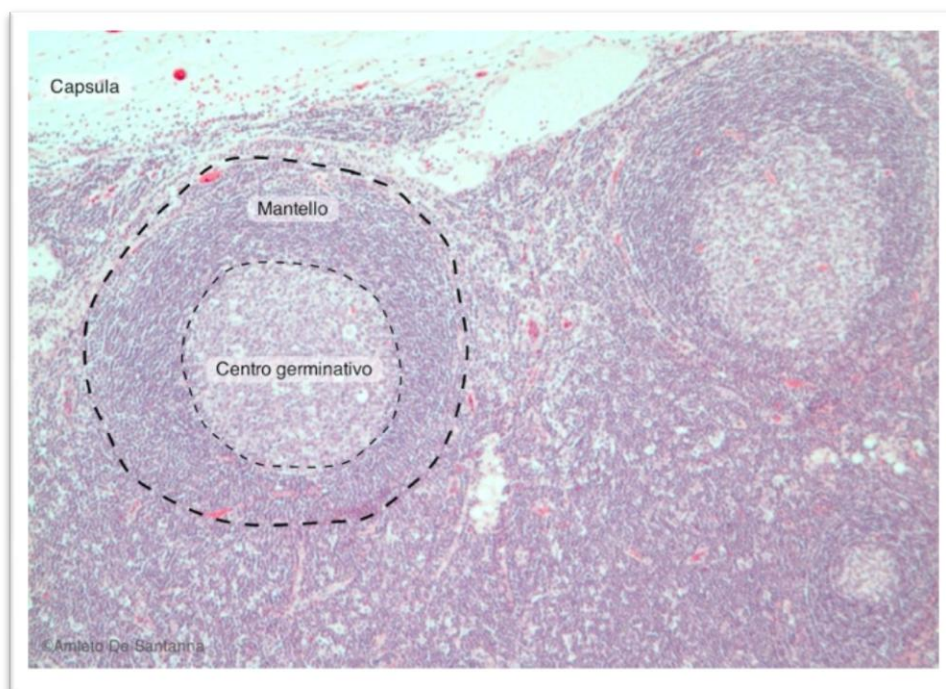


Figura 13 – Preparato istologico di Linfonodo. Particolare evidenza di due follicoli secondari presenti a livello della zona corticale. Al centro del follicolo è presente una zona più chiara, il centro germinativo del Flemming, e intorno una zona più scura, il mantello. (Amleto de Santanna)

La parte superficiale della **zona corticale** è ricca di follicoli primari e secondari, nei quali vi sono linfociti B non attivati. La cosiddetta zona paracorticale (parafollicolare), contiene invece linfociti T. Nella **zona paracorticale**, detta anche “area dei linfociti T”, con cui si intende la parte profonda della zona corticale, i linfociti T sono distribuiti in modo uniforme, circondati da cellule dendritiche interdigitanti e venule. I linfociti B liberi entrano nella zona paracorticale e restano qui in contatto con i linfociti T, con la possibilità di scatenare una prima reazione immunitaria. In seguito i linfociti B arrivano nel follicolo.

La **zona midollare** dei linfonodi è composta da un sistema di trabecole connettivali nel quale decorrono numerosi piccoli vasi sanguigni, negli spazi liberi delle maglie reticolari si radunano cellule immunitarie, plasmacellule e macrofagi fagocitanti.

I linfonodi servono al filtraggio attivo della linfa prima del passaggio nella circolazione. Le cellule del sistema immunitario specifico e aspecifico si occupano dell'eliminazione delle cellule danneggiate esogene ed endogene della circolazione linfatica. I fagociti mononucleati (macrofagi liberi) assorbono ad es. frammenti cellulari, batteri, virus, tossine e pigmenti esogeni, mentre i linfociti B e T e le plasmacellule reagiscono in modo citotossico o specifico attraverso la formazione di anticorpi.

La funzione del linfonodo è strettamente legata alla struttura dei vasi linfatici e alla loro distribuzione nella zona corticale e midollare. I vasi linfatici afferenti dopo il passaggio attraverso la capsula si allargano nel seno marginale e sottocapsulare, proseguono ad angolo retto attraverso la zona corticale lungo le trabecole corticali (seni intermedi divisi in trabecolari e corticali) e si raggruppano in un seno midollare con un sistema cavernoso, il quale confluisce in un vaso linfatico efferente, che lascia l'organo attraverso l'ilo.

La parete dei seni non forma un sistema chiuso, ma fenestrato per consentire alle cellule linfatiche di entrare liberamente nel tessuto reticolare lasso. Il rivestimento endoteliale è composto da cellule reticolari modificate. Nel lume dei seni sono presenti dei macrofagi, che sono considerati parte del

sistema fagocitario mononucleare (MPS). Anche gli antigeni solubili che circolano nella linfa possono passare attraverso le pareti dei seni nelle maglie reticolari e attivare in loco i macrofagi e linfociti T. Per scatenare la reazione immunitaria i linfociti T sono stimolati localmente grazie alla mediazione dei macrofagi. Questi linfociti trasmettono l'informazione ad altri linfociti nei follicoli e la cascata immunitaria della difesa cellulare è attivata. Le zone paracorticali timo dipendenti aumentano di volume, i centri reattivi dei follicoli proliferano attraverso l'attivazione di linfociti B, plasmacellule e cellule della memoria. Il linfonodo aumenta di dimensioni. Le plasmacellule attivate migrano nel seno midollare e rilasciano in loco nella linfa gli anticorpi specifici.

4.2 Milza

La milza è l'organo linfatico più voluminoso in tutti i mammiferi domestici. Contrariamente agli altri organi linfatici è collegata alla circolazione sanguigna. Data la sua posizione la milza svolge una serie di funzioni particolari che servono alla "purificazione" del sangue e dei suoi componenti cellulari.

Nella milza si svolge innanzi tutto la distruzione e la degradazione degli eritrociti vecchi e la filtrazione del plasma tramite i macrofagi attivati. Nei mammiferi la milza serve inoltre da deposito di sangue, contrariamente a quanto avviene nell'uomo e nei roditori. La funzione di deposito è particolarmente sviluppata nel cavallo e nei carnivori. Fino ad un terzo del sangue e delle piastrine circolanti possono essere depositate nella milza. La milza svolge così anche una funzione di regolazione della circolazione e serve quindi in senso lato anche alla regolazione del calore corporeo. Nei mammiferi domestici la milza è coinvolta inoltre nella difesa immunitaria. I follicoli linfatici sono componenti del sistema immunitario e sono coinvolti nella formazione dell'immunità cellulare e umorale e nella maturazione dei linfociti T e B. Anche la trasformazione dei monociti in macrofagi attivi avviene nella milza. La milza non è tuttavia un organo vitale. In caso di rimozione (splenectomia) le sue funzioni possono essere svolte dal midollo osseo, ma anche dal fegato e dai linfonodi.

La milza è ricoperta in superficie da una capsula stratificata su cui poggia esternamente la tonaca sierosa. La tela sottosierosa è composta da uno strato di connettivo lasso, attraversato da vasi da una robusta rete elastica connettivale contenente fasci di fibre muscolari lisce. Dallo strato capsulare interno si diramano nel parenchima splenico (polpa splenica) dei setti connettivali, appiattiti o tondi (trabecole), che suddividono parzialmente l'organo. Lungo i setti connettivali più grandi decorrono arterie e vene. La disposizione di questa rete muscolare fibroelastica ha una grande importanza per la funzione di organo di riserva ematica che la milza assolve. Tramite la contrazione attiva di questo sistema, regolata dalle fibre nervose simpatiche, il contenuto ematico può essere svuotato rapidamente.

Il tessuto di sostegno di questo organo è composto da una rete tridimensionale di cellule reticolari e fibre reticolari nelle cui maglie è presente il parenchima linfatico. Il parenchima splenico si articola in due parti:

- Polpa bianca
- Polpa rossa

Si definisce polpa bianca l'insieme formato da: follicoli splenici e guaine periarteriolari (PALS).

La zona marginale è presente al confine tra polpa bianca e rossa. Nella polpa rossa è presente una stretta correlazione tra i vasi sanguigni periferici della polpa bianca e i sinusoidi della polpa rossa ricoperti di macrofagi e cellule reticolari immunologicamente attive (cellule reticolari dendritiche). Soprattutto in queste zone di confine della milza si verificano le reazioni immunitarie specifiche e aspecifiche. La polpa rossa è formata da una rete lassa di cellule reticolari e fibre reticolari che si allungano a formare dei cordoni splenici. Tra le maglie di questa rete sono presenti eritrociti, leucociti, trombociti e macrofagi. La trama reticolare è attraversata da spazi ematici di diversa ampiezza, che si anastomizzano tra loro (sinusoidi). Le pareti di questi sinusoidi sono interrotte da fessure a decorso longitudinale, che consentono il passaggio delle cellule ematiche. In queste zone si accumulano di preferenza i macrofagi in fagocitosi

attiva. Nella milza i vasi sanguigni si diramano in modo caratteristico. Le arterie che entrano nell'ilo splenico si dividono più volte in arterie trabecolari tortuose da cui si diramano le arterie centrali, che passano nel parenchima splenico. Le arterie centrali sono circondate per un lungo tratto da un manicotto di tessuto linfatico, la guaina linfatica periarteriolare (PALS). Nell'attraversare la polpa rossa i vasi si diramano da due a sei volte formando una specie di pennello (arterie penicillari) e arrivano ai sinusoidi. Subito dopo questa suddivisione le pareti dei vasi sono avvolte da un mantello di cellule fagocitanti. I capillari sfociano nei seni (sinusoidi) della polpa rossa (circolazione aperta). Parecchi sinusoidi si raccolgono tramite le vene della polpa nelle vene trabecolari e lasciano di nuovo l'organo attraverso la vena splenica nell'ilo. (Liebich, 2012)

La caratterizzazione delle cellule del sistema immunitario tramite immunoistochimica è di fondamentale importanza in quanto permette di definire la risposta immunitaria e i processi infiammatori nei vari organi, al fine di chiarire la patogenesi delle varie malattie in animali domestici e selvatici. A questo riguardo le cellule del sistema immunitario sono state caratterizzate in diverse specie di ruminanti domestici (bovino, capra e pecora) (Navarro J.A. et al 1996, Gonzalez L et al., 2001) e selvatici (cervo + ruminanti africani) (Oleaga A, et al., 2012). Ad oggi però, manca un dettagliato studio immunoistochimico delle cellule del sistema immunitario del camoscio. In letteratura è riportato esclusivamente un lavoro in cui viene descritta la mancata reazione di alcuni anticorpi anti-antigeni umani con cellule del sistema immunitario di camoscio, in soggetti sani e affetti da rogna sarcoptica (Rode et al, 1998).

Per quanto riguarda la pecora sono state caratterizzate le cellule del sistema immunitario in linfonodi fissati in Sali di zinco, da cui sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Pecora, Linfonodo (Gonzalez L et al., 2001)

Antigene Riconoscimento in immunoistochimica	Reattività	Distribuzione
CD4+	T- helper	Piccolo gruppo di cellule rotondeggianti nella zona paracorticale dei LNF, adiacenti alla periferia del follicolo, presenza di alcune cellule sparse nei follicoli.
CD8+	T- citotossici	Gruppi di cellule rotondeggianti sparse o raggruppate nella zona paracorticale dei nodi, assenti nel follicolo
CD21+	Linf B maturi, cell dendritiche	Presenti nella zona chiara del centro germinativo del follicolo
MHCII	Linf B, Linf T attivate, Macrofagi, Cell dendritiche	Presente una grande popolazione cellule rotondeggianti nei follicoli corticali e nella zona paracorticale, presenza di cellule sparse nei cordoni midollari.
CD14	Macrofagi e Monociti	Presenza di grandi cellule, con abbondante citoplasma con nuclei ovoidali pallidi e singole cellule sparse o gruppi lineari di cellule nei cordoni midollari, assenti nei follicoli
CD45 RA	Linf B, Linf T	Presenza di piccole cellule rotondeggianti nella parte corticale dei LNF, soprattutto nei follicoli ma anche a livello della zona paracorticale

Nella capra sono state caratterizzate le cellule in milza, linfonodi e placche del Peyer con i seguenti risultati:

CAPRA, (Navarro J.A. et al 1996)

LINFONODO:

	Centro germinativo	Corona esterna	Zona interfollicolare	Zona Paracorticale	Cordoni midollari
Linf B	X	X	X		X
CD2+	X	X	X	X	X
CD4+	X	X	X	X	X
CD8+	-	-	X	X	X

La x indica la presenza di cellule

MILZA (Navarro J.A. et al 1996):

	Centro germinativo	Corona esterna	Guaine periarteriolarì	Zona marginale	Polpa rossa
Linf B	X	X	-	-	X
CD2+	X	X	X	X	X
CD4+	X	X	X	X	X
CD8+	-	-	X	X	X

La x indica la presenza di cellule

5 MATERIALI E METODI

5.1 Animali

Nell'ambito di questo lavoro sono stati studiati camosci alpini (*Rupicapra rupicaprae*) di diversa provenienza geografica; come illustrato in (Figura 14) le aree interessate erano le provincie di:

- Belluno
- Lecco
- Val d'Ossola

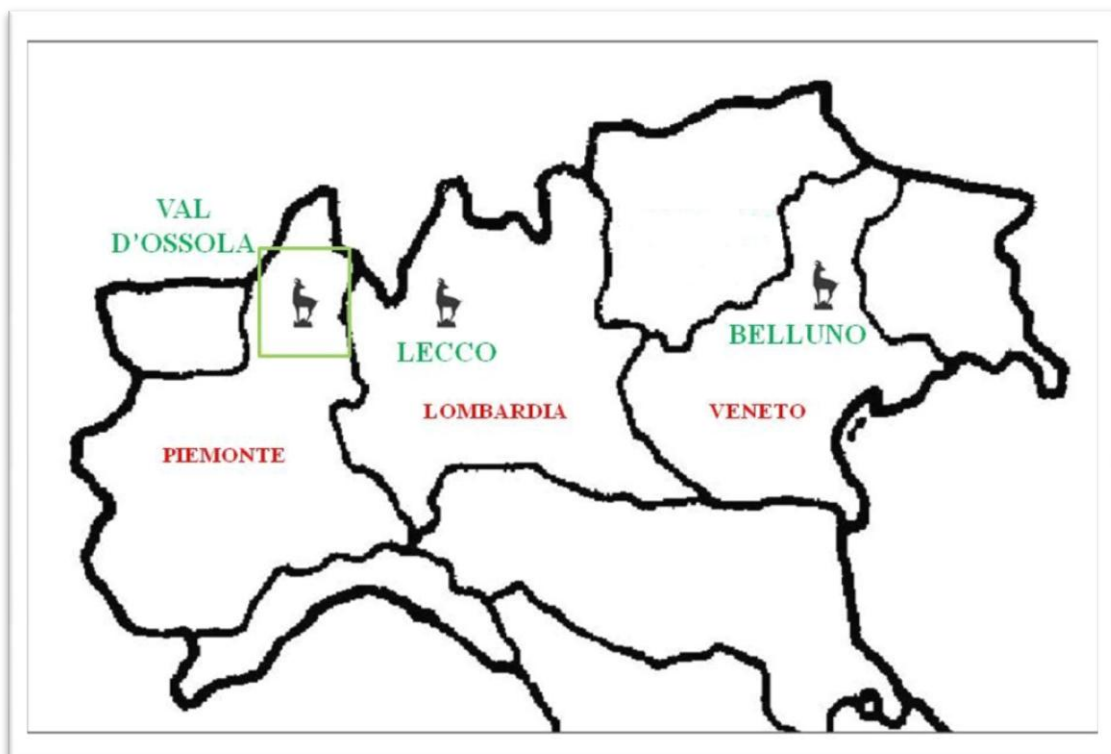


Figura 14 - Localizzazione dei camosci interessati dal nostro studio

Gli animali oggetto di studio provenivano dall'attività venatoria dei cacciatori delle zone in questione; una volta abbattuti, i camosci venivano portati in centri di raccolta appositi, dislocati nelle zone limitrofe: Trontano per la zona della Val d'Ossola, Cortina d'Ampezzo per le province di Belluno, Lecco per le province di Lecco. Il corpo della Guardia Forestale, presente nei centri di raccolta, si occupava di registrare gli animali abbattuti identificandone

età, peso e sesso, mentre i medici veterinari effettuavano i prelievi di tessuti, feci e sangue.

5.2 FASI DELLO STUDIO

Il presente studio si suddivide in due parti, la prima ha come obiettivo quello di mettere a punto i protocolli immunoistochimici al fine di valutare la distribuzione cellulare a livello dei principali organi linfoidi: milza e linfonodi. In questa fase, denominata Fase 1, sono stati indagati in particolar modo due metodi di fissazione dei tessuti e la cross-reattività di anticorpi monoclonali anti-antigeni cellulari umani nei confronti di cellule di camoscio

A tale scopo sono stati presi in esame tessuti linfoidi di 18 animali, il cui segnalamento viene riportato in Tabella 1.

Tabella 1 - Segnalamento dei camosci oggetto di studio

	Numero di registrazione	Numero camoscio	Zona di abbattimento	Sesso	Età	Milza	Linfonodo
1	598731	IZSVe 5	Crosetta, Venal de Funes, Chies D'Alpago(Belluno)	M	Adulto		X
2	587862 - 31-61	IZSVe 2	Pecol, Pieve D'Alpago (Belluno)	F	Giovane	X	
3	569441	IZSVe 1	La Rota, San Vito di Cadore (Belluno)	F	Giovane	X	X
4	83042/45C	78	Col dei Bos, Tofane, Cortina d'Ampezzo (Belluno)	F	8		X
5	83042/41D	71	Rio Secco, Moggio Udinese (Belluno)	F	3		X
6	83649/21B	8330	Alpi - Muggio (Lecco)	F	1	X	X
7	83649/23B	9239	Prealpi - Resegone			X	X
8	83649/24B	8302				X	X
9	83649/26B		Sondrio (Lecco)	M	1	X	
10	83649/30	8353	Prealpi- Camoscio Grigne	F	1	X	X
11	83649/34A	9468					X
12	82679/35B	9236	Prealpi - Resegone	M	8		X
13	82679/41B	82835	Malesco (Valdossola)	F	10		X
14	82679/57	83250	Re (Valdossola)	F	14	X	
15	82679/72D	82131	Malesco (Valsossola)	F	7	X	
16	82679/74E	83003	Premia (Valdossola)	F	1	X	
17	82679/76C	100685	Trontano (Valdossola)	M	2	X	
18	82679/80B	82130	Premia (Valdossola)	F	3	X	

La seconda parte dello studio, definita Fase 2, ha come fine la valutazione della risposta cellulare cutanea a livello delle lesioni causate da rogna sarcoptica e altra parassitosi. I campioni pervenuti presso il nostro laboratorio sono stati fissati esclusivamente in formalina. I protocolli sopra standardizzati sono stati riportati per i tessuti cutanei presi in oggetto. A questo scopo sono stati impiegati 14 tessuti cutanei di soggetti affetti da rogna sarcoptica, 15 soggetti

affetti da altra ectoparassitosi e 10 soggetti sani, presi come controllo negativo. Il segnalamento di tali gruppi di animali è riportato rispettivamente in Tabella 2, Tabella 3 e Tabella 4.

Tabella 2 - Identificazione animali affetti da rogna sarcoptica

	Numero di registrazione	Numero camoscio	Zona di abbattimento	Sesso	Età
1	5878 1.1	IZSVe 1	Pecol, Pieve D'Alpago, Belluno	F	Adulta
2	83042/47	IZSVe 2 13BL1531	Pecol, Pieve D'Alpago (Belluno)	F	Giovane
3	83042/49 A,B	IZSVe 4 13BL-D/1551	Belluno	M	Giovane
4	5987 1.1	IZSVe 5	Crosetta, Venal de Funes, Chies D'Alpago (Belluno)	M	Adulto
5	83042/50	IZSVe 5 13BL-D/1552	Belluno	F	3
6	83042/51A, B	IZSVe 6	Cava, Farra d'Alpago (Belluno)	M	3
7	83042/52 A	IZSVe 7	Costa Viezzer, Sedico (Belluno)	F	2
8	5694 3.1 e 2.1	IZSVe 1	La rota, San Vito di Cadore (Belluno)	F	Giovane
9	83042/46 A, B	IZSVe 1	Belluno	M	1
10	5986 2.1. e 1.1	IZSVe 4	Scalet, Pieve d'Alpago (Belluno)	M	Giovane
11	83042/48	IZSVe 3	Le Rosse basse, Sospirolo (Belluno)	F	Adulta
12	83042/45 E,F,G	78	Col dei Bos, Tofane, Cortina d'Ampezzo (Belluno)	F	8
13	83042/41 A	71	Rio Secco, Moggio Udinese (Belluno)	F	3
14	83042/31 B	43	Rusiana, Auronzo di Cadore (Belluno)	F	7

Tabella 3 - Identificazione animali affetti da altra ectoparassitosi

	Numero di registrazione	Numero camoscio	Zona di abbattimento	Sesso	Età
1	83649/3	09404	Prealpi, Campelli Maesimo (Lecco)	M	6
2	83649/14	08353	Prealpi, Camoscio Grigne (Lecco)	F	1
3	83649/35	09236	Prealpi, Resegone (Lecco)	M	8
4	82679/74	83003	Premia (Val d'Ossola)	F	1
5	82679/22	81993	Malesco (Val d'Ossola)	F	2
6	82679/94	99271	Montecrestese (Val d'Ossola)	F	1
7	82679/97	82134	Malesco (Val d'Ossola)	M	1
8	82679/113	82132	Craveggia (Val d'Ossola)	F	1
9	82679/141 B	99268	Craveggia (Val d'Ossola)	F	1
10	82679/70	81670	Druogno (Val d'Ossola)	F	1
11	83649/16	9407	Prealpi, Campelli Maesimo (Lecco)	F	1
12	82679/69	88376	Trontano (Val d'Ossola)	F	4
13	83649/8	9241	Lecco	M	2
14	83649/79	9482	Lecco	M	Adulto
15	82679/105	100449	S. Maria Maggiore (Val d'Ossola)	M	6

Tabella 4 - Identificazione Camosci non infestati

	Numero di registrazione	Numero camoscio	Zona di abbattimento	Sesso	Età
1	82679/75	82015	S. Maria Maggiore (Val d'Ossola)	F	4
2	82679/118	82068	Premia (Val d'Ossola)	F	17
3	83649/9	8278	Alpi, Barchitt (Lecco)	M	1
4	82679/8	82148	Malesco (Val d'Ossola)	M	8
5	83649/18	8320	Alpi, Barchitt (Lecco)	M	2
6	85331/9	-	Lecco		
7	855331/15	-	Lecco	-	-
8	84482/67	75305	Val d'Ossola	-	-
9	84482/71	62114	Val d'Ossola	-	-
10	84482/24	69513	Val d'Ossola	-	-
11	85331/1	-	Lecco 2015	-	-
12	85331/5	-	Lecco 2015	-	-
13	85331/4	-	Lecco 2015	-	-
14	85331/3	-	Lecco 2015	-	-
15	85331/6	-	Lecco 2015	-	-
16	85331/7	-	Lecco 2015	-	-
17	85331/8	-	Lecco 2015	-	-
18	85331/9	-	Lecco 2015	-	-
19	85331/10	-	Lecco 2015	-	-
20	85331/11	-	Lecco 2015	-	-
21	85331/12	-	Lecco 2015	-	-
22	85331/13	-	Lecco 2015	-	-
23	85331/14	-	Lecco 2015	-	-
24	85331/15	-	Lecco 2015	-	-
25	85331/16	-	Lecco 2015	-	-
26	85331/17	-	Lecco 2015	-	-
27	85331/19	-	Lecco 2015	-	-
28	85331/20	-	Lecco 2015	-	-
29	85331/21	-	Lecco 2015	-	-
30	85331/22	-	Lecco 2015	-	-

I soggetti sani, oggetti di studio, provenivano da aree indenni e non manifestavano sintomatologia clinica riferibile ad una malattia ectoparassitaria, quale *Sarcoptes scabiei*.

5.3 Preparazione dei campioni

5.3.1 Preparazione dei campioni di milza e linfonodo.

Per la Fase 1 del presente studio sono stati impiegati tessuti linfoidei di 18 camosci alpini, di età compresa tra 1 e 14 anni, in particolar modo: 9 linfonodi retro mandibolari e 10 milze.

Sono stati effettuati, per ciascun organo, due campioni di spessore compreso tra 4 e 5 mm, fissati in Sali di Zinco (ZSF)¹ per 24-48 ore (Gonzales et al, 2001) e in formalina al 10% per 48-72 ore. Tutti i campioni sono stati inclusi in paraffina e successivamente sezionati con microtomo ad uno spessore di 5 µm. Tutte le sezioni sono state montate su vetrini trattati (Superfrost Plus, Menzel-Glaser, Germany) per immunoistochimica; le sezioni provenienti da campioni fissati in formalina sono state colorate anche con ematossilina-eosina (HE).

5.3.2 Preparazione dei campioni di tessuti cutanei

Per la Fase 2 sono stati impiegati tessuti cutanei di 14 animali affetti da rogna sarcotica, 15 animali affetti da altra ectoparassitosi e 30 animali sani (i primi 10 di Tabella 4), di età compresa tra 1 e 17 anni.

Sono state effettuate, per ciascun campione, sezioni dello spessore di circa 4-5 mm. Una volta tagliate le sezioni sono state fissate in formalina al 10% per 48-72 ore. Tutti i campioni sono stati inclusi in paraffina e successivamente sezionati con microtomo ad uno spessore di 5 µm.

Tutte le sezioni sono state montate su vetrini e colorate con HE per una prima valutazione.

5.3.2.1 Score per la valutazione dello stato cellulare delle lesioni cutanee

Per valutare la gravità e la cellularità delle lesioni cutanee determinate dagli acari, sono stati utilizzati i criteri di score definiti da H. Nimmervoll et al., 2013, in uno studio sulla volpe. In Tabella 5 sono riportati i parametri di score applicati nel presente studio.

¹ **Protocollo per fissazione in Sali di Zinco. 0,1 M Tris Buffer, pH 7,4:** Tris Base, 12,1 g; 1N HCl 81,5 ml; Acqua distillata, 900 ml. **Fissativo di Zinco:** Acetato di Calcio, 0,5g; Acetato di Zinco, 5 g; Cloruro di Zinco 5g; 0,1 M Tris Buffer, fatto come indicato: 1000 ml. Ph finale = 6,5-7.

Tabella 5 - Indici di valutazione (H. Nimmervoll et al., 2013)

Caratteristiche	Misurazioni	Punteggio attribuito			
		0	1	2	3
Croste	Spessore (mm; sezione trasversale macroscopica della cute)	Assenza di croste	<2.5	2.5-3.5	>3.5
Alopecia	Numero di follicoli piliferi che contengono peli (%)	Macro. Pelliccia normale	>55	45-55	<45
Acari	Conteggio a 10X HPF in un campo selezionato random	0	1-2	3-6	>6
Eosinofili	Conteggio a 40X HPF in due campi selezionati random	0-1	2-10	11-20	>20
Linfociti		0	1-15	15-30	>50
Mastociti		0	1-15	15-40	>40

Una volta eseguita questa prima valutazione sono state effettuate, per ciascun campione, sezioni dello spessore di circa 4-5 μm e successivamente montate su vetrini trattati (Superfrost Plus, Menzel-Glaser, Germany) per immunoistochimica

5.3. Immunoistochimica

Le sezioni, una volta tagliate e poste sui vetrini, sono state incubate in stufa a 37°C per l'asciugatura ed una miglior adesione al vetrino stesso. Una

volta pronte, sono state sparaffinate in xilolo I e II e reidratate in soluzioni a concentrazioni decrescenti di alcohol, 100%, 95%, 75%, in bagni sequenziali di 5 minuti ciascuno. Dopo reidratazione i vetrini sono stati lavati 2 volte per 5 minuti con acqua distillata. Le sezioni dei tessuti fissati in formalina venivano ulteriormente trattate, a seconda dell'anticorpo primario impiegato, le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 6, per effettuare lo smascheramento degli epitopi antigenici (Antigen retrieval, Tabella 7). Il trattamento di Antigen retrieval è fondamentale in quanto la fissazione del tessuto tramite formalina al 10% determina la formazione di legami crociati tra il liquido fissativo e gruppi attivi delle proteine, con mascheramento di molti siti antigenici.

Tabella 6 - Caratteristiche degli Anticorpi primari e dei metodi usati per le tecniche di immunoistochimica

Marker cellulare	Tipo cellulare riconosciuto	Clone	Specie e isotipo	Specie animale riconosciuta	Diluiz.	Colorazione in tess. Fissati in Sali di Zn	Colorazione in tess. Fissati in Formalina
CD3	Linfociti T	F7.2.38 ¹	Mouse IgG1	uomo	1:100	Si	Si
CD4	Linfociti T-helper	17D ²	Mouse IgG1	ovino	1:400	Si	No
CD8	T cytotoxic cell	7C2 e ILA51 ³	Mouse IgG1	ovino	Non diluito	No	No
TCR $\gamma\delta$	Linfociti TCR $\gamma\delta$	86D ²	Mouse IgG1	uomo	Non diluito	No	No
CD21	Cellule dendritiche follicolari e linfociti B maturi	CC21 ⁴	Mouse IgG1	ovino	1:500	Si	No
CD79 α	Linfociti B	HM57 ¹	Mouse IgG1	uomo	1:50	Si	Si
CD68	Macrofagi	EBM11 ¹	Mouse IgG1	uomo	1:50	Si	Si
Foxp3	Linfociti T-reg	mAbcam 22510	Mouse	uomo	1:100	No	No

¹Dako UK Ltd.; ² Basel Institute for Immunology, Basel, Switzerland; ³ Moredun Research Institute, Edinburgh, UK; ⁴ Institute for Animal Health, Compton, UK.

Per i tessuti fissati in Sali di zinco il trattamento di smascheramento degli epitopi non è necessario, in quanto questo tipo di fissazione non altera la conformazione delle proteine.

Come riportato in Tabella 7, sono stati eseguiti due trattamenti per ripristinare l'antigenicità dei tessuti.

Dopo alcuni tentativi per valutare l'efficacia dei due metodi per il recupero dell'antigenicità è stato osservato che il trattamento con recupero a caldo in soluzione tampone citrato permetteva un miglior smascheramento antigenico per i campioni destinati all'anticorpo primario anti-CD3 e anti-CD79 α , mentre il trattamento enzimatico con proteinasi K (Figura 15) per l'anticorpo primario anti-CD68.

Tabella 7 - Trattamenti utilizzati per lo smascheramento antigenico

Trattamento	Protocollo	Obiettivo
Trattamento enzimatico con Proteinasi K	2-3 gocce di proteinasi K sono state depositate sulla sezione di tessuto interessata, ricoprendola interamente lasciando agire per 15 minuti a temperatura ambiente	Gli enzimi proteolitici permettono la rottura dei legami aldeidici rendendo i siti antigenici disponibili per il relativo anticorpo.
Recupero a caldo in soluzione tampone citrato pH 6	I vetrini sono stati inseriti in apposito contenitore, immersi in 250 ml di Tampone citrato, posti in microonde per 4' e 30'' a 650 W e successivamente 15' a 350 W e lasciati raffreddare a temperatura ambiente per almeno 20'	

Antigen retrieval: ⁵ Dako, Proteinasi K S3020, Lotto 10085468; ⁶ Tampone citrato di sodio (10 mM Tampone citrate di sodio, 0,05% Tween 20, pH 6: Citrato Tri-sodico 2,94 g, acqua distillata 1000 ml + 0,5 ml di Tween 20



Figura 15 - Trattamento con proteinasi K

I tessuti, successivamente, sono stati sottoposti a blocco delle perossidasi endogene, per impedire che tali enzimi reagissero con il cromogeno DAB, falsando i risultati. A tal scopo i vetrini sono stati immersi per 10 minuti al buio in acqua ossigenata diluita al 30% con acqua distillata.

Una volta eseguito il blocco delle perossidasi i vetrini sono stati lavati in acqua distillata e montati manualmente utilizzando il sistema Shandon (Sequenza slide rack and coverplate system. Shandon, Runcorn, UK) (Figura 16). Il montaggio è stato eseguito ponendo alcune gocce di soluzione tampone, PBST², sul coverplate della camera del sistema, a cui veniva fatto aderire il vetrino che, successivamente veniva inserito nell'apposito contenitore. Una volta montato è stato effettuato un lavaggio con PBST per verificarne il corretto funzionamento.

² PBST: Euroimmun, PBS, 10.2 g, pH 7.2 in 1000 ml di acqua distillata, + 0,5 ml di Tween 20

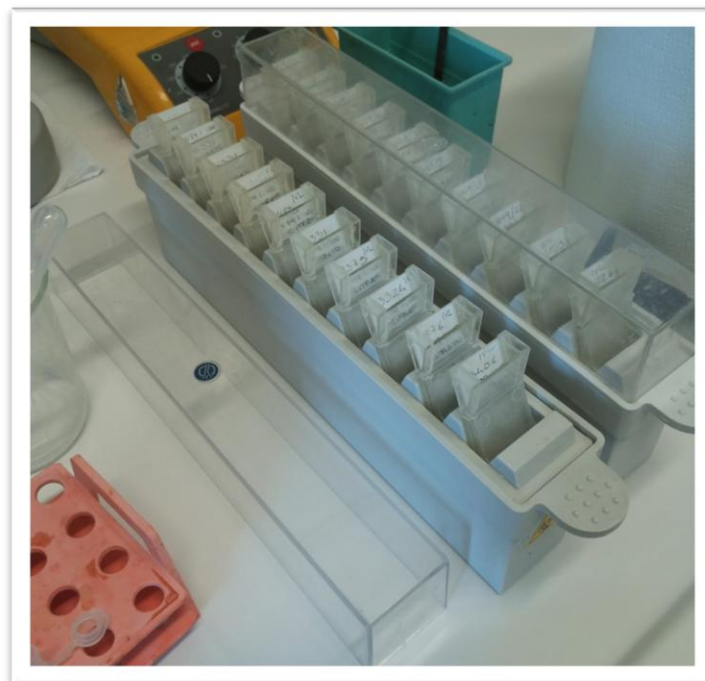


Figura 16 - Sistema "Shandon"

I vetrini venivano quindi incubati per 30 minuti con Siero normale di Capra (NGS, Dako, Normal Goat Serum, X0907, 20011859), diluito al 25% in PBST. Dopo 30 minuti, senza ulteriori lavaggi, veniva aggiunto l'anticorpo monoclonale primario opportunamente diluito in PBST + 25%NGS (vedi Tab 7) ed incubato overnight a 4°C.

I vetrini venivano tenuti a temperatura ambiente per circa 10 minuti, e quindi lavati 4 volte con PBST. Dopo l'ultimo lavaggio, i vetrini venivano incubati per 30 minuti con anticorpo secondario marcato con perossidasi (Dako Envision Labelled Polymer HRP anti-mouse, K4007). Fatti altri 4 lavaggi con PBST veniva aggiunto il cromogeno (3,3-diaminobenzidina, DAB Dako Envision) diluito nel tampone dedicato per circa 10-15 minuti. La reazione veniva bloccata con un lavaggio con acqua di fonte.

Successivamente i vetrini sono stati colorati con Ematossilina-Eosina, reidratati in soluzioni crescenti di alcohol e xilolo e montati con vetrini copri oggetto.

5.4 Conteggio cellulare

Un volta eseguita la colorazione immunoistochimica, le sezioni sono state osservate al microscopio (Leica DMR) e fotografate con ingrandimento 20X per il conteggio cellulare con fotocamera digitale (Leica Microsystem DFC490).

Il numero totale di cellule ed il numero di cellule positive per CD3, CD79 α , CD68, CD21, e CD4 è stato contato utilizzando un sistema di analisi semiautomatico (LASV 4.3, Leica, Germany).

5.4.1 Conteggio cellulare per linfonodi e milza

Per il conteggio cellulare sono stati utilizzati 5 campi random di 10.000 μm^2 ciascuno, delle seguenti aree:

LINFONODO

- Centro germinativo
- Zona mantellare
del follicolo linfatico
- Area interfollicolare e paracorticale
- Cordoni midollari

MILZA

- Centro germinativo
- Zona mantellare
del follicolo linfatico
- Guaine linfatiche periarteriolari
- Zona marginale
- Polpa rossa

5.5 Conteggio cellulare per i tessuti cutanei

Per il conteggio cellulare dei tessuti cutanei sono stati utilizzati 8 campi random della dimensione di $10.000 \mu\text{m}^2$, comprendendo epidermide e strato superficiale del derma in corrispondenza della lesione.

5.6 Analisi statistica

5.6.1 Analisi statistica linfonodi e milza

Per ciascun marker, anticorpo ed area all'interno di entrambi gli organi, è stata valutata la differenza tra la media percentuale di cellule positive per ciascun metodo di fissazione. È stato impiegato un modello di analisi statistica definito "Modello lineare generalizzato misto" (GLM) con cui sono state confrontate, come parametri costanti i due diversi fissativi e come risposta variabile la percentuale media di cellule positive. Sono state incluse nell'analisi le caratteristiche degli animali come variabile "random" allo scopo di considerare la variabilità entro e tra gli animali.

Per ciascuna area tissutale e per ciascun anticorpo, sono state calcolate la percentuale media di cellule positive osservate su tessuti fissati in modi diversi (formalina e Sali di zinco), i limiti di confidenza superiore ed inferiore al 95% e il valore di p dal test di statistico di significatività di likelihood ottenuto dal corrispondente GLM. Sono stati considerati solo gli anticorpi rilevabili con entrambe le tecniche di fissazione. Differenze con valori di $p < 0,05$ sono state considerate significative. Il confronto tra medie di cellule positive, è stato eseguito con "Test del chi quadrato" e "Anova" ad una via. Differenze con valori di $p < 0,05$ sono state considerate significative.

**FASE 1 : studio metodi di fissazione e
valutazione cross-reattività anticorpi monoclonali**

6 RISULTATI FASE 1

6.1 Analisi linfonodo

Per ciascuna delle 4 aree di osservazione del linfonodo (descritte in Materiali e metodi) sono state contate la percentuale di cellule positive rispettivamente per CD3, CD4, CD79, CD21 e CD68, con entrambi i metodi di fissazione utilizzati. In tabella 8 sono riportati i dati espressi come media di cellule positive, limite superiore ed inferiore corrispondenti ad intervallo di confidenza del 95%.

Tabella 8 - Percentuale media di cellule positive e limiti di confidenza al 95% per area e metodo di fissazione per i linfonodi

			CD3	CD4	CD79	CD21	CD68
Centro germinativo	Sali di zinco	Limite sup	11.17	4.55	69.32	98.73	13.2
		Media	10.47	4.08	68.25	98.49	12.53
		Limite inf	9.81	3.66	67.15	98.19	11.84
	Formalina	Limite sup	7.19	NA	88.26	NA	11.49
		Media	6.55	NA	87.47	NA	10.77
		Limite inf	5.97	NA	86.64	NA	10.08
Zona mantellare	Sali di zinco	Limite sup	25.66	11.14	47.56	97.70	6.58
		Media	24.73	10.50	46.46	97.39	6.11
		Limite inf	23.83	9.89	45.37	97.05	5.67
	Formalina	Limite sup	23.96	NA	39.70	NA	5.45
		Media	23.02	NA	38.64	NA	4.98
		Limite inf	22.11	NA	37.59	NA	4.54
Zona interfollicolare/ paracorticale	Sali di zinco	Limite sup	97.29	70.62	4.69	11.27	8.18
		Media	96.95	69.66	4.25	10.61	7.62
		Limite inf	96.56	68.68	3.85	9.99	7.10
	Formalina	Limite sup	95.83	NA	2.62	NA	1.67
		Media	95.39	NA	2.27	NA	1.40
		Limite inf	94.91	NA	1.97	NA	1.17

			CD3	CD4	CD79	CD21	CD68
Cordoni midollari	Sali di zinco	Limite sup	24.59	20.04	4.99	21.42	21.50
		Media	23.42	18.97	4.42	20.34	20.41
		Limite inf	22.28	17.94	3.92	19.29	19.37
	Formalina	Limite sup	28.36	NA	11.72	NA	33.59
		Media	27.19	NA	10.92	NA	32.29
		Limite inf	26.06	NA	10.17	NA	31.01

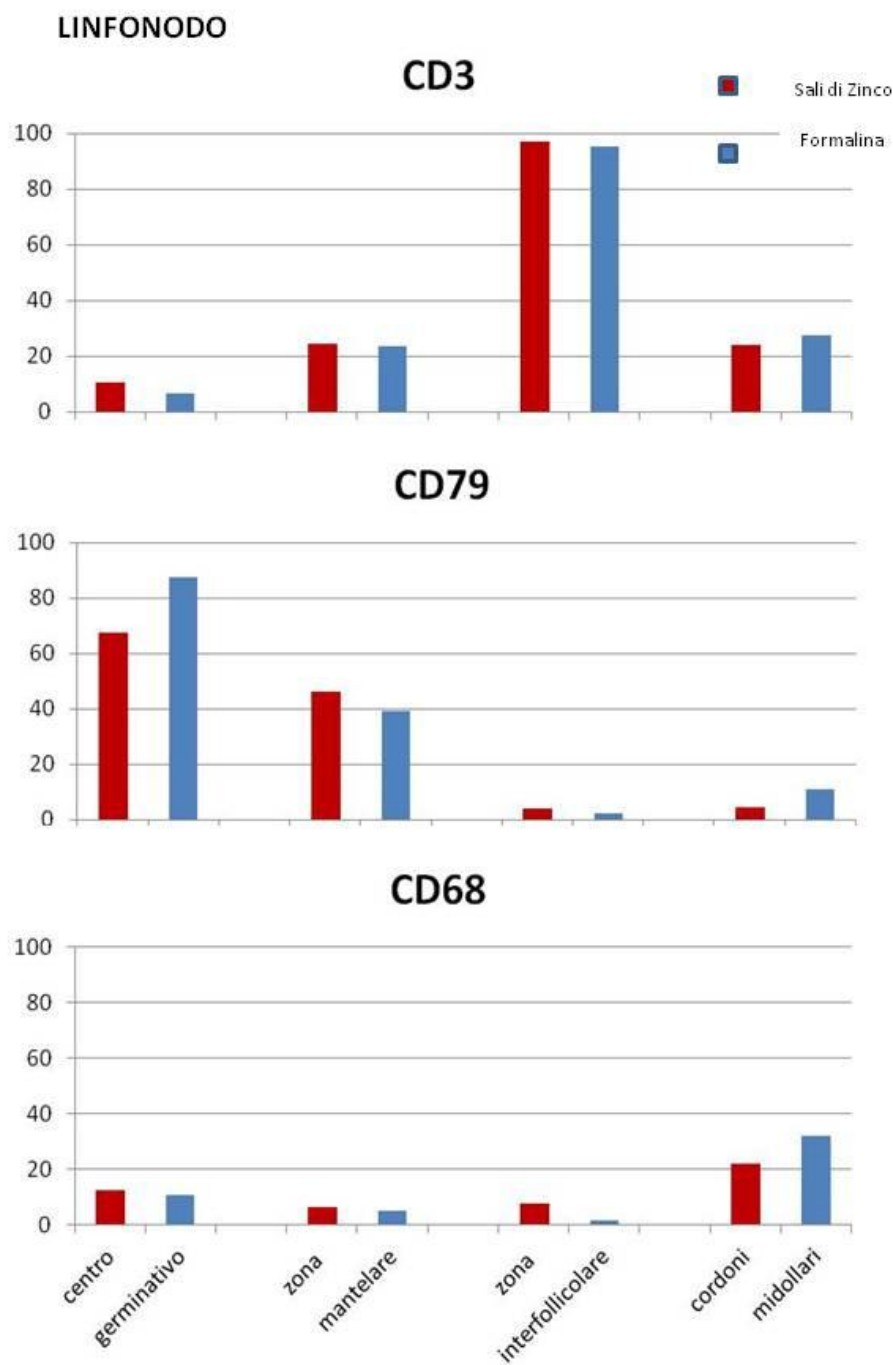
Come si può osservare in

Tabella 8, per gli anticorpi CD4 e CD21 non è stato sempre possibile eseguire i conteggi con entrambi i metodi di fissazione. E' stato quindi deciso di non includere questi due anticorpi nell'analisi statistica che è stata limitata agli anticorpi CD3, CD79 e CD68. Per questi tre anticorpi sono state confrontate le percentuali medie di cellule positive ottenute con i due diversi metodi di fissazione nelle 4 aree del linfonodo. I risultati di p ottenuti con un sistema generalizzato misto sono riportati in Tabella 9.

Differenze con valori di $p < 0,05$ sono state considerate significative.

Tabella 9 - Percentuale media di cellule positive per metodo di fissazione e valore di p ottenuto con analisi GLMN

		CD3	CD68	CD79
Centro germinativo	Media Sali di Zn	10.3300	12.5400	67.5300
	p	0.1571	0.0400	0,0004
	Media Formalina	6.6500	10.7400	87.4400
Zona mantellare	Media Sali di Zn	24.5800	6.3900	46.2200
	p	0.9065	0.8479	0.0113
	Media Formalina	23.3900	4.9800	38.9800
Zona interfollicolare/ paracorticale	Media Sali di Zn	96.9500	7.6800	4.1500
	p	0.1283	0.0000	0.0030
	Media Formalina	95.2800	1.3800	2.2800
Cordoni midollari	Media Sali di Zn	24.1100	22.0500	4.4000
	p	0.6923	0.0286	0.0156
	Media Formalina	27.4200	32.0800	10.7900



L'analisi dei dati per area linfonodale evidenzia che a seconda del metodo di fissazione utilizzato si osservano o meno differenze significative nella percentuale di cellule positive per CD3, CD68 e CD79 come riportato in dettaglio di seguito:

- a) Nel **centro germinativo** non si hanno differenze significative nelle medie tra le due tecniche di fissazione per gli anticorpi CD3 ($p=0,1571$) e CD68 ($p=0,0400$). La differenza è statisticamente significativa per CD79, infatti nei tessuti fissati in formalina è stata rilevata una percentuale più alta di cellule positive (87,44% vs. 67,53% $p=0,0004$).
- b) Nella **zona paracorticale/interfollicolare** non ci sono differenze significative nelle medie a seconda della tecnica di fissazione per i CD3 ($p=0,1283$). Al contrario, le differenze per quanto riguarda i CD68 ($p<0,0001$) e i CD79 ($p=0,0030$) sono altamente significative, infatti i tessuti fissati in Sali di zinco rivelano rispetto a quelli in formalina la più alta percentuale di cellule positive in entrambi i casi.
- c) Nella **zona mantellare** le differenze significative si riscontrano solo per i CD79 ($p=0,0113$) infatti, i tessuti fissati in Sali di zinco rivelano una più alta percentuale di cellule positive.
- d) Nei **cordoni midollari** differenze significative sono state ottenute per i CD68 ($p=0,0286$) e i CD79 ($p=0,0156$) con livelli superiori di cellule positive nei campioni fissati in formalina che superano quelli osservati con i sali di zinco con entrambi gli anticorpi.

6.2 Analisi della Milza

Per ciascuna delle 5 aree di osservazione della milza (descritte in Materiali e metodi) sono state contate la percentuale di cellule positive rispettivamente per CD3, CD4, CD79, CD21 e CD68, con entrambi i metodi fissazione utilizzati. In Tabella 10 sono riportati i dati espressi come media di cellule positive, limite superiore ed inferiore corrispondenti ad intervallo di confidenza del 95%.

Tabella 10 - Percentuale media di cellule positive e limiti di confidenza al 95% per area e tecnica di fissazione nella milza

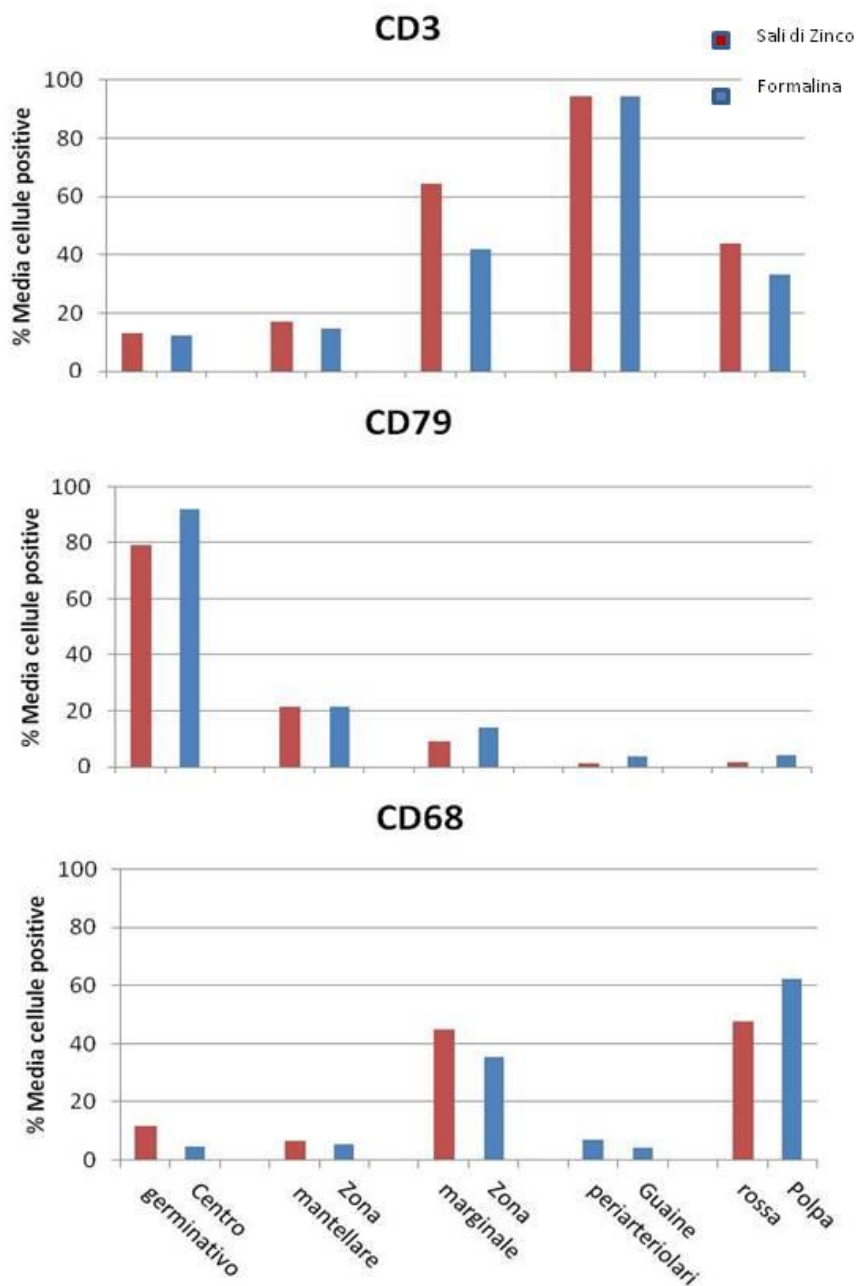
			CD3	CD4	CD79	CD21	CD68
Centro germinativo	Sali di zinco	Limite sup	13.71	7.73	80.37	99.51	11.82
		Media	12.97	7.14	79.56	99.36	11.11
		Limite inf	12.27	6.59	78.72	99.16	10.44
	Formalina	Limite sup	12.69	NA	91.93	NA	4.82
		Media	11.93	NA	91.38	NA	4.38
		Limite inf	11.21	NA	90.78	NA	3.97
Zona mantellare	Sali di zinco	Limite sup	17.62	9.72	22.60	99.76	6.84
		Media	16.84	9.11	21.68	99.66	6.32
		Limite inf	16.08	8.53	20.79	99.51	5.83
	Formalina	Limite sup	14.58	NA	21.82	NA	5.67
		Media	13.91	NA	21.05	NA	5.25
		Limite inf	13.28	NA	20.29	NA	4.85
Zona marginale	Sali di zinco	Limite sup	65.80	5.07	9.68	34.49	45.80
		Media	64.65	4.56	8.97	33.36	44.59
		Limite inf	13.28	NA	20.29	NA	4.85
	Formalina	Limite sup	42.99	NA	13.96	NA	36.46
		Media	41.94	NA	13.27	NA	35.43
		Limite inf	40.90	NA	12.62	NA	34.40
Guaine periarteriolari	Sali di zinco	Limite sup	94.79	61.95	1.41	10.28	6.85
		Media	94.34	60.97	1.17	9.67	6.33
		Limite inf	93.87	59.98	0.97	9.09	5.85
	Formalina	Limite sup	94.91	NA	4.24	NA	4.31
		Media	94.50	NA	3.90	NA	3.96
		Limite inf	94.07	NA	3.58	NA	3.64
Polpa rossa	Sali di zinco	Limite sup	46.38	2.16	2.27	4.04	50.93
		Media	44.83	1.69	1.82	3.41	49.46
		Limite inf	43.30	1.32	1.45	2.88	48.00
	Formalina	Limite sup	35.54	NA	4.93	NA	63.64
		Media	34.18	NA	4.36	NA	62.45
		Limite inf	32.85	NA	3.85	NA	61.24

Come per i linfonodi, per alcune aree non è stato possibile eseguire i conteggi con entrambi i metodi di fissazione, relativamente agli anticorpi CD4 e CD21. E' stato quindi deciso di non includere questi due anticorpi nell'analisi statistica che è stata limitata agli anticorpi CD3, CD79 e CD68. Per questi tre anticorpi sono state confrontate le percentuali medie di cellule positive ottenute con i due diversi metodi di fissazione nelle 4 aree della milza. I risultati di p ottenuti con un sistema generalizzato misto sono riportati in Tabella 11. Differenze con valori di $p < 0,05$ sono state considerate significative..

Tabella 11 - Percentuale media di cellule positive nella milza per metodo di fissazione e valore di p ottenuto dal corrispondente GLMN

		CD3	CD68	CD79
Centro germinativo	Media Sali di Zn	13.100	11.5900	79.2300
	P	0.5793	0.0000	0.0000
	Media Formalina	12.2500	4.3600	91.7700
Zona mantellare	Media Sali di Zn	17.0000	6.3500	21.6300
	P	0.4863	0.3644	0.6792
	Media Formalina	14.8700	5.2500	21.2500
Zona marginale	Media Sali di Zn	64.2400	44.8300	9.0500
	P	0.0244	0.0415	0.5176
	Media Formalina	41.9400	35.4600	14.1100
Guaine perioarteriolari	Media Sali di Zn	94.3900	6.8700	1.1600
	P	0.8655	0.0734	0.0000
	Media Formalina	94.3800	3.9500	3.9200
Polpa rossa	Media Sali di Zn	44.0900	47.7500	1.8000
	P	0.2126	0.0281	0.0051
	Media Formalina	33.3200	62.3500	4.2000

MILZA



Dai dati sopra riportati si può evincere che, a livello delle aree prese in esame, si riscontrano le seguenti differenze per gli anticorpi oggetto di studio in base al tipo di fissativo impiegato:

- Nel **centro germinativo** non ci sono differenze statisticamente significative tra le due tecniche di fissazione impiegate per i CD3. Ci

sono differenze statisticamente significative per i CD68 con un $p < 0,0001$, con la più alta percentuale di cellule positive nei tessuti fissati in Sali di zinco, e per i CD79 con $p < 0,0001$ con una più alta percentuale di cellule positive nei tessuti fissati in formalina.

- b) Nella **zona mantellare** non ci sono differenze significative tra le medie percentuali di cellule positive trovate per gli anticorpi presi in esame.
- c) Nella **zona marginale** ci sono differenze significative per i CD3 ($p=0,0244$) e marginalmente anche per i CD68 ($p=0,0415$), infatti, nei tessuti fissati in Sali di zinco è stata riscontrata la percentuale più alta di cellule positive. Questo non è il caso dei CD79, per cui non ci sono differenze significative per entrambe le tecniche di fissazione ($p=0,5176$).
- d) Nelle **guaine periarteriolari** vi è differenza significativa a differenza del metodo di fissazione per i CD79 ($p=0,0001$) la cui percentuale più alta è stata rilevata nei tessuti fissati in formalina.
- e) Nella **polpa rossa** non sono state rilevate differenze significative per i CD3 ($p=0,2126$). Per i CD68 ($p=0,0281$) e per i CD79 ($p=0,0051$) è stata rilevata una percentuale più alta di cellule positive nei tessuti fissati in formalina rispetto a quelli in Sali di zinco.

6.3 Distribuzione cellulare a livello di linfonodo e milza

6.3.1 CD3

L'anticorpo monoclonale anti-CD3 umano ha colorato in modo evidente, ben definito e senza fondo i tessuti, fissati sia in Sali di zinco che formalina. In quest'ultimo caso, è stato necessario trattare le sezioni con calore in soluzione tampone citrato a pH 6 per effettuare la rivelazione antigenica degli epitopi. L'anti-CD3 marca la superficie e il citoplasma delle cellule situate principalmente nell'area T, denominata area paracorticale/interfollicolare dei linfonodi e le guaine periarteriolari linfoide della milza. Una prevalenza di cellule CD3⁺ è inoltre evidente a livello della zona marginale della milza e nei cordoni midollari dei linfonodi. Un numero moderato di cellule CD3⁺ si osserva nella zona mantellare dei follicoli di linfonodi e milza mentre raramente

linfociti CD3⁺ sono presenti nel centro germinativo dei follicoli (Figura 17, Figura 18).

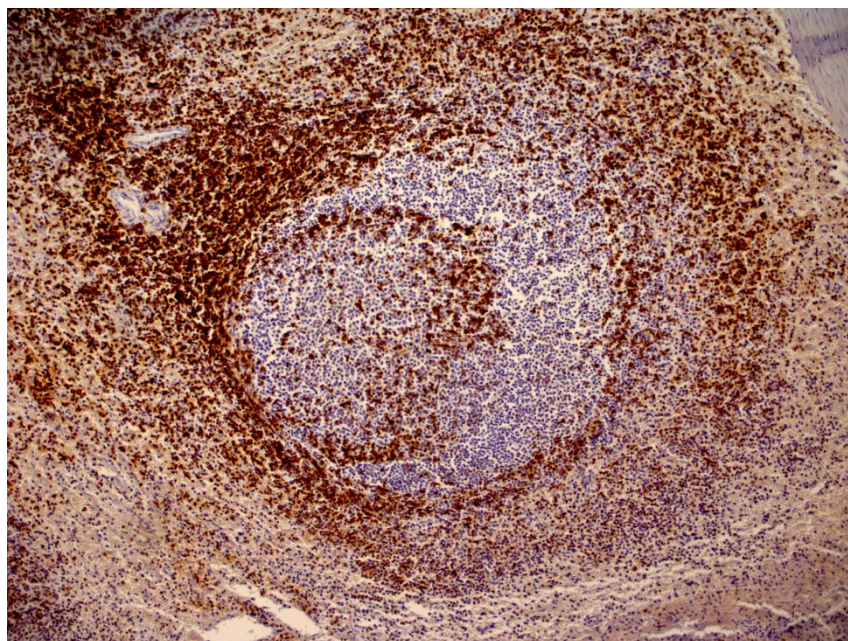


Figura 17 – Colorazione Immunoistochimica in sezione istologica di milza per identificazione di cellule CD3⁺

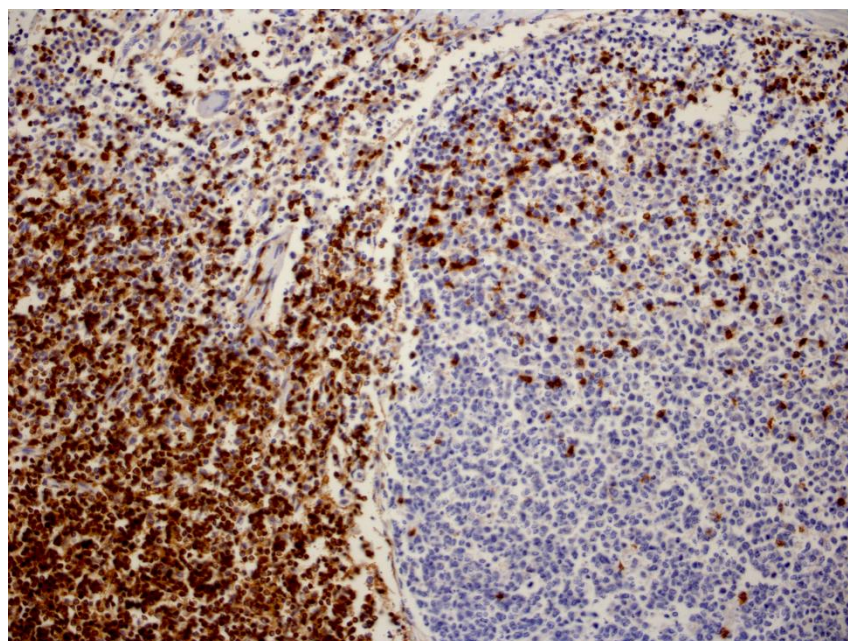


Figura 18 – Colorazione Immunoistochimica in sezione istologica di linfonodo per identificazione di cellule CD3⁺

6.3.2 CD79

L' anticorpo anti-CD79 α umano ha permesso di marcare la membrana e il citoplasma dei linfociti B. Le cellule CD79 α sono localizzate principalmente nel centro germinativo e nella zona mantellare dei follicoli di linfonodi e milza. Aggregati multifocali di linfociti CD79 α positivi sono evidenti anche nella zona midollare dei linfonodi e nella zona marginale della milza. Nella zona midollare, cellule positive sono localizzate soprattutto intorno ai piccoli vasi sanguigni e sono evidenti aggregati multifocali di grandi cellule positive a livello citoplasmatico. E' stato osservato inoltre che Cellule muscolari lisce e cellule endoteliali dei piccoli vasi sanguigni, talvolta reagiscono positivamente con l' anticorpo anti CD79 α (Figura 19 e Figura 20)

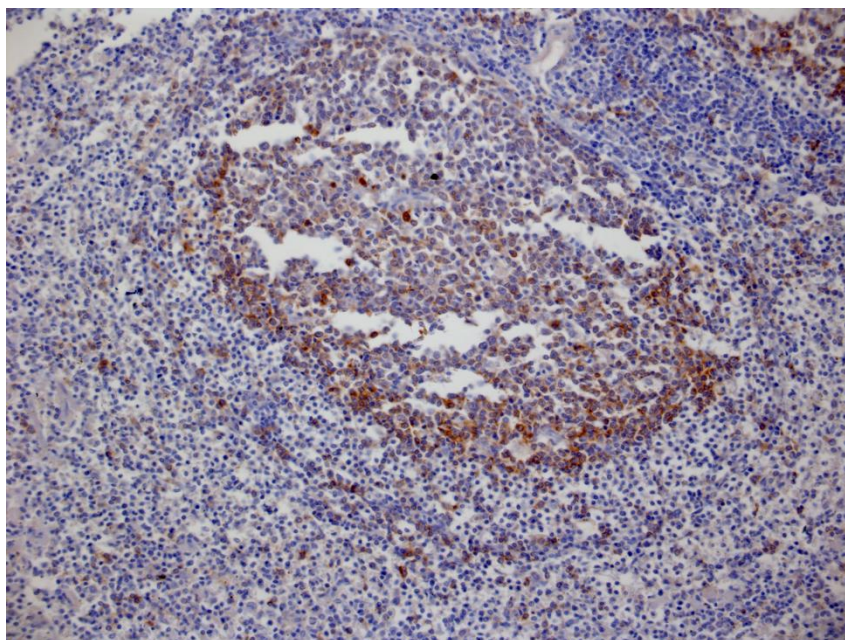


Figura 19 – Colorazione Immunoistochimica in sezione istologica di milza per identificazione di cellule CD79⁺

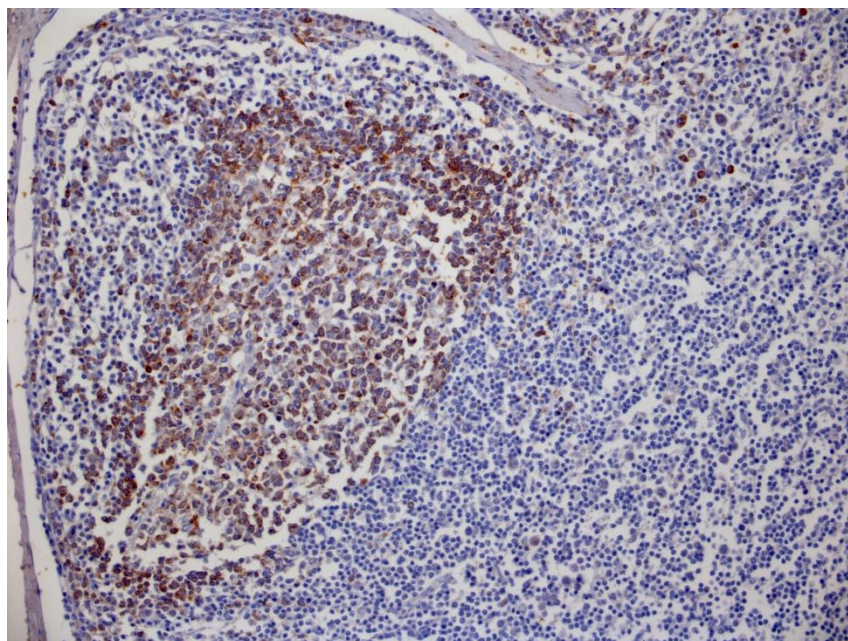


Figura 20 – Colorazione Immunoistochimica in sezione istologica di linfonodo per identificazione di cellule CD79⁺

6.3.3 CD68

Usando l' anticorpo monoclonale anti-CD68 umano È stata osservata una colorazione granulare intracitoplasmatica per cellule morfologicamente compatibili con i macrofagi. Il segnale risultava forte e specifico sia nei tessuti fissati in Sali di zinco ch nei tessuti fissati in formalina. Le cellule CD68 positive sono localizzate soprattutto a livello di cordoni midollari del linfonodo e della zona marginale della polpa rossa della milza (Figura 21e Figura 22)

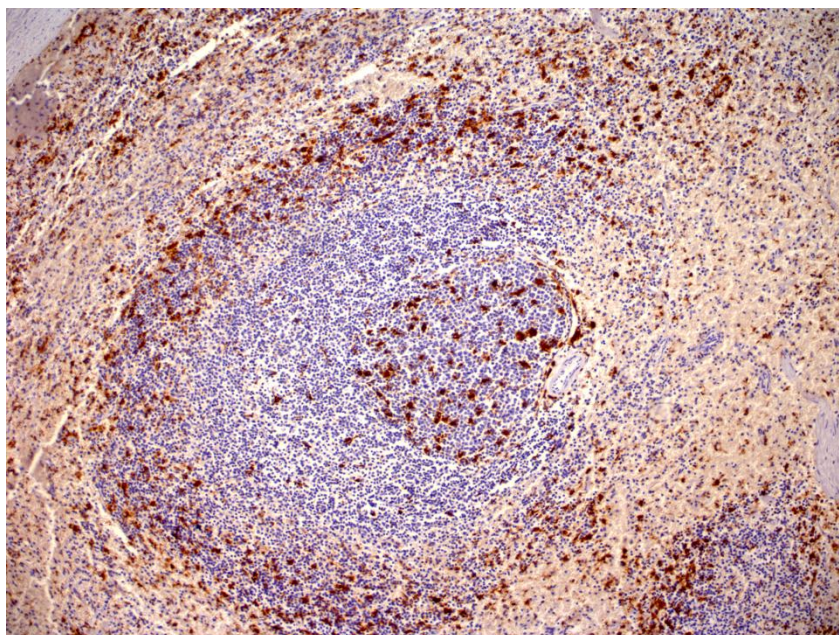


Figura 21 – Colorazione Immunoistochimica in sezione istologica di milza per identificazione di cellule CD68⁺

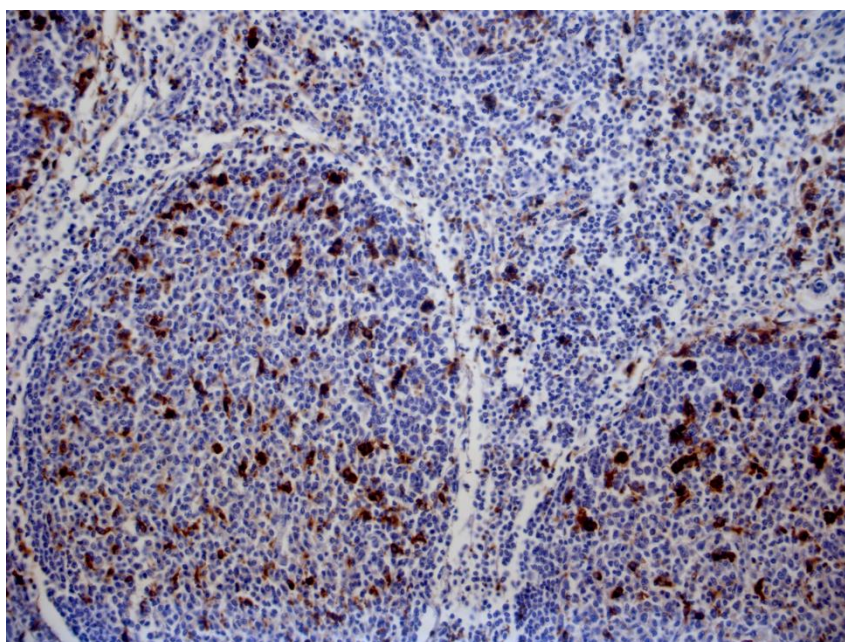


Figura 22 – Colorazione Immunoistochimica in sezione istologica di linfonodo per identificazione di cellule CD68⁺

6.3.4 CD4

È stato ottenuto un chiaro e specifico segnale con l' anticorpo monoclonale 17D, che riconosce le cellule T-helper, ha colorato in modo chiaro e specifico le cellule unicamente nei tessuti fissati in Sali di zinco. Le cellule CD4⁺,

sono piccole cellule rotondeggianti, la cui distribuzione rispecchia quella delle cellule CD3⁺, con una percentuale media più alta nella zona paracorticale/interfollicolare del linfonodo (69,66%) e nelle guaine periarteriolari della milza (60,79%)

6.3.5 CD21

L'anticorpo anti-CD21 ha colorato unicamente i tessuti fissati in Sali di Zinco. L'anticorpo anti-CD21 ha marcato piccole cellule rotondeggianti e soprattutto cellule con un pattern reticolare nella zona chiara del centro germinativo e nella zona mantellare del linfonodo (98,49%) e nei follicoli della milza. La distribuzione delle cellule CD21⁺ è simile a quella delle CD79α⁺. Tuttavia, in tutte le aree considerate la percentuale di cellule CD21⁺ risultava essere più alta rispetto a quella delle CD79α

6.3.6 CD8 e TCRγδ

Nel caso degli anticorpi anti CD8 e TCR γδ non è stato rilevato alcun segnale nonostante siano stati usati più monoclonali derivati da cloni diversi, sia nei tessuti fissati in Sali di zinco che in formalina. Gli stessi monoclonali impiegati su tessuti di controllo rappresentati da linfonodi di ovino (controllo positivo) hanno colorato detti tessuti escludendo la possibilità che gli anticorpi potessero non funzionare. Nessun segnale è stato ottenuto nel vetrino per il controllo negativo.

6.3.7 T-reg Foxp3⁺

Nel caso dell'anticorpo anti-Foxp3 non è stato rilevato alcun segnale nonostante siano stati usati due diversi anticorpi monoclonali derivati da cloni diversi, sia nei tessuti fissati in Sali di zinco sia in formalina. Gli stessi monoclonali impiegati su tessuti di controllo rappresentati da tonsille umane (controllo positivo) hanno colorato detti tessuti escludendo la possibilità che gli anticorpi potessero non funzionare. Nessun segnale è stato ottenuto nel vetrino usato come controllo negativo.

7 CONCLUSIONI FASE 1

Dal punto di vista istologico i tessuti di milza e linfonodo di camoscio sono simili alle altre specie di ruminanti domestici, topo e cervo (Cesta, 2006; Drayton et al., 2006; Willard-Mack, 2006).

In questo studio la colorazione con HE mostra che la morfologia dei tessuti è ben conservata e riconoscibile con entrambe le tecniche di fissazione utilizzate : formalina e sali di zinco. Inoltre la colorazione con HE delle sezioni di linfonodo ha rivelato una distribuzione normale dei follicoli linfatici sferici nella corteccia superficiale separata dalla corteccia interfollicolare. La paracorteccia è interposta tra la corteccia e i cordoni midollari. Nella milza, sono ben riconoscibili polpa bianca, polpa rossa e la zona marginale, posta al confine tra polpa rossa e follicoli splenici e le guaine periarteriolarie della polpa bianca.

Per identificare le diverse componenti cellulari del sistema immunitario sono stati impiegati anticorpi monoclonali. Non essendo disponibili anticorpi specie-specifici per il camoscio, è stato necessario utilizzare anticorpi anti-antigeni umani. Di alcuni anticorpi usati era nota la cross-reattività con altre specie animali, ma per nessuno era stata descritta una cross-reattività con questa specie.

L'anticorpo monoclonale anti-CD3 umano utilizzato (clone F7.2.38) riconosce la catena CD3 ϵ , può essere considerato un marcatore specifico per le cellule T e cross reagisce con i linfociti T dei tessuti di pecore e cervi (Chianini et al., 2013; Daglaeish et al., 2012). Nel presente studio reagisce positivamente con i tessuti marcati con entrambi i metodi di fissazione, dimostrando di cross-reagire anche con i linfociti T di camoscio.

Gli epitopi CD4, rilevati dal monoclonale ovino (clone 17D) ed espressi dai linfociti T-helper, sono stati correttamente identificati in una sottopopolazione di cellule CD3⁺ la cui distribuzione rifletteva quella dei linfociti T.

L'anticorpo monoclonale anti-CD79 α umano (clone HM57) è specifico per i linfociti B e cross reagisce con tessuti ovini, di bufalo e di cervo (Canton et al., 2014; Chianini et al., 2013; Daglaeish et al., 2012). L'anti-CD79 reagendo anche sui tessuti di camoscio, ha mostrato una cross-reattività con gli epitopi dei linfociti B di camoscio.

L'anticorpo anti-CD21 è specifico per i linfociti B ovini. Questo monoclonale ha cross-reagito con i linfociti B di camoscio evidenziando che la distribuzione delle cellule CD21⁺ rispecchia quella delle cellule CD79 α ⁺. Nelle nostre osservazioni, la percentuale di linfociti B CD21⁺ è superiore a quelle dei linfociti B CD79 α . Questa diversa capacità di identificazione dei linfociti B potrebbe essere dovuta al diverso tipo di epitopo riconosciuto dai due monoclonali. Infatti CD21 denominato anche CR2 o recettore per il complemento di tipo 2, è un recettore per il complemento che potenzia notevolmente la risposta funzionale dei linfociti B. CD21 fa parte inoltre del complesso recettoriale dei linfociti B insieme a CD19 e CD81 ed è espresso su linfociti B mature e su cellule dendritiche del follicolo (Thiel et al., 2012). Nei tessuti di camoscio, oggetto di questo studio, l'anticorpo monoclonale CD21 ha marcato inoltre cellule di forma reticolare e dendritica.

L'anticorpo monoclonale anti-CD68 umano (clone EBM11) riconosce specificamente i macrofagi ed è stata descritta la sua cross-reattività con macrofagi bovini (Herder et al., 2013). Colorando positivamente cellule di tessuti linfoidi di camoscio, l'anti-CD68 umano mostra di cross reagire con macrofagi di camoscio.

In questo studio, l'uso di anticorpi monoclonali specifici per popolazioni linfocitarie umane diverse ha consentito di valutare la presenza nei tessuti di camoscio delle differenti componenti cellulari permettendo una immunofenotipizzazione cellulare in situ. Gli anticorpi monoclonali di topo anti-uomo, CD3, CD79 e CD68, hanno mostrato una buona cross-reattività con gli antigeni dei camosci. Analogamente, gli anticorpi anti CD4 e CD21 ovini hanno colorato con successo i linfociti di camoscio. Gli anticorpi monoclonali anti -CD8 e anti- $\gamma\delta$ TCR, non hanno colorato le cellule del sistema immunitario.

del camoscio, lo stesso insuccesso è stato descritto per i tessuti di cervo (Daglaeish et al, 2012).

L'analisi immunoistochimica delle sezioni di linfonodi e milza dei camosci della Fase 1 dello studio oggetto di questa tesi, mostra che la reattività e la distribuzione delle cellule del sistema immunitario negli organi linfoidei del camoscio sono simili a quelle descritte nella capra (Navarro et al., 1996), nella pecora (González et al., 2001), nel maiale (Chianini et al., 2001; Tingsted et al., 2003), nel bovino (Galeotti et al., 1993) e nel cervo (Dagleish et al., 2012).

I linfociti T (CD3⁺) sono localizzati in prevalenza nella zona paracorticale/interfollicolare dei linfonodi e nelle guaine periarteriolari della milza. I linfociti B (CD79⁺ e CD21⁺) si riscontrano in maniera predominante nel centro germinativo del follicolo mentre, i macrofagi (CD68⁺) nei cordoni midollari e seni dei linfonodi e nella zona marginale e polpa rossa della milza. In accordo con quanto riportato in precedenti studi di immunoistochimica in tessuti di cervo e pecora, i nostri dati confermano che la fissazione in Sali di zinco permette una buona preservazione della morfologia tissutale ed una miglior conservazione degli epitopi antigenici sulla superficie cellulare, evitando l'impiego di ulteriori trattamenti per il ripristino dell' antigenicità. Per questo motivo, la marcatura specifica per le cellule CD4 e CD21 positive è stata eseguita esclusivamente in tessuti fissati in Sali di zinco. Per quanto riguarda la marcatura dei macrofagi positivi CD68, è stato osservato che si ottiene una miglior marcatura su tessuti fissati in sali di zinco come dimostrato dalla media percentualmente più alta in questi tessuti rispetto a quelli fissati in formalina. Questi risultati confermano quanto noto riguardo la fissazione con sali di zinco che essendo un fissativo non aldeidico, composto da una soluzione di Sali di zinco in tampone acetato tris calcico, preservano correttamente gli antigeni durante il processo di fissazione (Beckstead 1994).

Contrariamente a quanto riportato per gli altri monoclonali, l'anti-CD79alfa ha marcato una percentuale più alta di cellule nei tessuti fissati in formalina, mentre la marcatura dei CD3, sembra essere non influenzata dal tipo di fissazione dal momento che si sono ottenute percentuali medie di cellule CD3⁺,

paragonabili con entrambi i metodi di fissazione. Diversi metodi di fissazione potrebbero modificare, diversamente, i recettori di superficie per l'interazione con la regione Fab (Fragment antigen binding) dell'anticorpo. La formalina è un fissativo che determina la formazione di legami crociati e che produce ponti metilenici tra i gruppi aminici e altri gruppi funzionali delle proteine da cui risultano cambiamenti nella conformazione ternaria e quaternaria all'interno delle proteine stesse (Ramos-Vara et al., 2008). Di conseguenza, per i tessuti fissati in formalina è necessario eseguire il passaggio tecnico dedicato al recupero antigenico (passaggio con tempi lunghi di esecuzione) per ripristinare i danni derivati dalla formalina. In questo studio, il trattamento con il calore per lo smascheramento antigenico con tampone citrato è stato usato per i marker CD3 e CD79 mentre il trattamento con proteinasi K per la marcatura dei CD68. Entrambi i trattamenti, se eseguiti correttamente, non alternano la morfologia dei tessuti.

**FASE 2 dello studio: valutazione
immunoistochimica della risposta immunitaria in
camosci affetti da rogna sarcoptica, camosci affetti
da altra ectoparassitosi e camosci sani.**

8 RISULTATI FASE 2

8.1 Attribuzione score

Oggetto della fase 2 dello studio sono animali appartenenti ai seguenti gruppi:

- a) Camosci affetti da rogna sarcoptica
- b) Camosci affetti da altra ectoparassitosi
- c) Camosci sani, di controllo

Per ciascun gruppo sono stati applicati i criteri di valutazione riportati in Tabella 5 per attribuire i relativi score alle osservazioni riferite alla gravità delle lesioni crostose, gravità alopecica, numero di acari, eosinofili, linfociti e mastociti. Gli score relativi agli animali sani sono riportati in Tabella 12, quelli relativi agli animali affetti da rogna sarcoptica in Tabella 13 ed infine quelli degli animali colpiti da altra ectoparassitosi in

Tabella 14.

Tabella 12 - Score camosci sani

	ID ANIMALE	Croste	Alopecia	Acari	Eosinofili	Linfociti	Mastociti
1	82679/75	0	0	1	1	2	0
2	82679/118	0	0	1	1	2	0
3	83649/9	0	0	0	1	1	0
4	82679/8	0	0	0	2	2	0
5	83649/18	0	1	0	1	2	0
6	85331/9	0	0	0	0	2	0
7	855331/15	0	0	0	0	2	0
8	84482/67	0	0	0	1	3	0
9	84482/71	0	0	0	3	2	0
10	84482/24	0	0	0	2	2	1
11	85331/1	0	0	0	0	1	0
12	85331/5	0	0	0	0	1	0
13	85331/4	0	0	0	0	1	0
14	85331/3	0	0	0	0	1	0
15	85331/6	0	0	0	0	1	0
16	85331/7	0	0	0	0	0	0
17	85331/8	0	0	0	0	2	0
18	85331/9	0	0	0	0	3	0
19	85331/10	0	0	0	0	2	0
20	85331/11	0	0	0	0	1	0
21	85331/12	0	0	0	0	1	0
22	85331/13	0	0	0	0	2	0
23	85331/14	0	0	0	0	2	0
24	85331/15	0	0	0	0	2	0
25	85331/16	0	0	0	0	1	0
26	85331/17	0	0	0	0	0	0
27	85331/19	0	0	0	0	1	0
28	85331/20	0	0	0	0	1	0
29	85331/21	0	0	0	0	1	0
30	85331/22	0	0	0	0	1	0

Tabella 13 - Score soggetti camosci affetti da rogna sarcoptica

	ID ANIMALE	Croste	Alopecia	Acari	Eosinofili	Linfociti	Mastociti
1	5878 1.1	3	3	3	1	2	1
2	83042/47	3	3	3	2	3	0
3	83042/49 A,B	3	3	3	1	3	1
4	5987 1.1	3	3	3	3	3	1
5	83042/50	3	3	3	3	2	0
6	83042/51A, B	3	3	3	1	2	0
7	83042/52 A	3	3	3	0	2	0
8	5694 3.1 e 2.1	2	3	2	1	2	1
9	83042/46 A, B	2	3	2	2	2	1
10	5986 2.1. e 1.1	2	2	3	1	2	1
11	83042/48	2	3	3	2	3	1
12	83042/45 E,F,G	1	3	2	2	2	0
13	83042/41 A	1	2	3	3	2	0
14	83042/31 B	1	3	3	2	3	1

Tabella 14 - Score camosci affetti da altra ectoparassitosi

	ID ANIMALE	Croste	Alopecia	Acari	Eosinofili	Linfociti	Mastociti
1	83649/3	0	1	1	2	1	0
2	83649/14	0	0	1	1	2	0
3	83649/35	0	0	1	1	3	0
4	82679/74	0	0	1	1	2	0
5	82679/22	0	0	1	0	2	0
6	82679/94	0	0	1	2	2	1
7	82679/97	0	0	2	1	2	1
8	82679/113	0	0	1	2	2	1
9	82679/141 B	0	0	1	1	2	2
10	82679/70	1	0	1	2	2	0
11	83649/16	1	2	1	2	2	1
12	82679/69	1	0	1	3	2	0
13	83649/8	1	1	1	1	2	0
14	83649/79	1	2	3	3	3	0
15	82679/105	1	0	1	1	3	0

8.2 Analisi dei parametri dermatopatologici nei gruppi di camosci esaminati

I dati relativi allo score sono riassunti nella Tabella 15 dove sono riportati il numero totale di soggetti per livello di score (0,1,2,3) per ciascuna variabile esaminata (croste, alopecia, acari, eosinofili, linfociti e mastociti) nelle tre popolazioni prese in esame:

Tabella 15 – Gravita delle lesioni, carica parassitaria e caratteristiche dell'infiltrato infiammatorio nei diversi gruppi dei soggetti esaminati.

	CROSTE				ALOPECIA				ACARI				EOSINOFILI				LINFOCITI				MASTOCITI			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Sani	30				30				30				22	5	2	1	2	13	13	2	29	1		
Altra Ectop.	9	6			11	2	2			13	1	1	1	7	5	2		1	11	3	10	4	1	
Rogna sarcoptica		3	4	7			2	12			3	11	1	5	4	3			9	5	6	8		

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente per verificarne il livello di significatività, utilizzando il test del chi quadrato in rapporto agli score 0 e 1 vs 2 e 3

Dall'analisi è risultato che:

- Per il parametro croste vi è significatività statistica tra il gruppo dei camosci con rogn sarcoptica e dei camosci sani ($p<0,001$), infatti in questi ultimi, come in quelli con l'altra ectoparassitosi non si riscontrano lesioni crostose di gravità 2 e 3. Una differenza significativa c'è anche tra i due gruppi parassitati da rogn sarcoptica e altra parassitosi, i primi hanno lesioni crostose più marcate ($p<0,001$).
- Per il parametro alopecia vi è significatività ($p<0,001$) nel confronto tra il gruppo di animali affetti da rogn sarcoptica e altra parassitosi; vi è significatività tra gli animali con entrambe le ectoparassitosi e il gruppo di controllo. In particolare tra gli animali affetti da rogn sarcoptica e i sani sia ha una significatività $p<0,001$, mentre per gli affetti da altra parassitosi e sani si ha un valore di $p<0,05$.

- Per quanto riguarda gli acari, non presenti nei soggetti sani, i soggetti con rogna sarcoptica hanno presentato una carica parassitaria maggiore ($p < 0,001$) rispetto ai camosci affetti da altra parassitosi.
- Per il parametro eosinofili vi è significatività tra gli animali con entrambe le ectoparassitosi e il gruppo di controllo. In particolare tra gli animali affetti da rogna sarcoptica e i sani sia ha una significatività $p < 0,001$ mentre per gli affetti da altra parassitosi e sani si ha un valore di $p < 0,01$.
- Per il parametro linfociti vi è significatività tra gli animali con entrambe le ectoparassitosi e il gruppo di controllo. In particolare tra gli animali affetti da rogna sarcoptica e i sani sia ha una significatività $p < 0,001$ mentre per gli affetti da altra parassitosi e sani si ha un valore di $p < 0,001$.
- Per i mastociti non sono state osservate differenze statisticamente significative.

8.3 Analisi delle componenti cellulari nelle tre popolazioni esaminate

E' stato contato il numero di cellule positive rispettivamente per CD3, CD79 e CD68, per meglio caratterizzare le sottopopolazioni cellulari che compongono gli infiltrati infiammatori risultati nelle cuti esaminate (Figura 23)

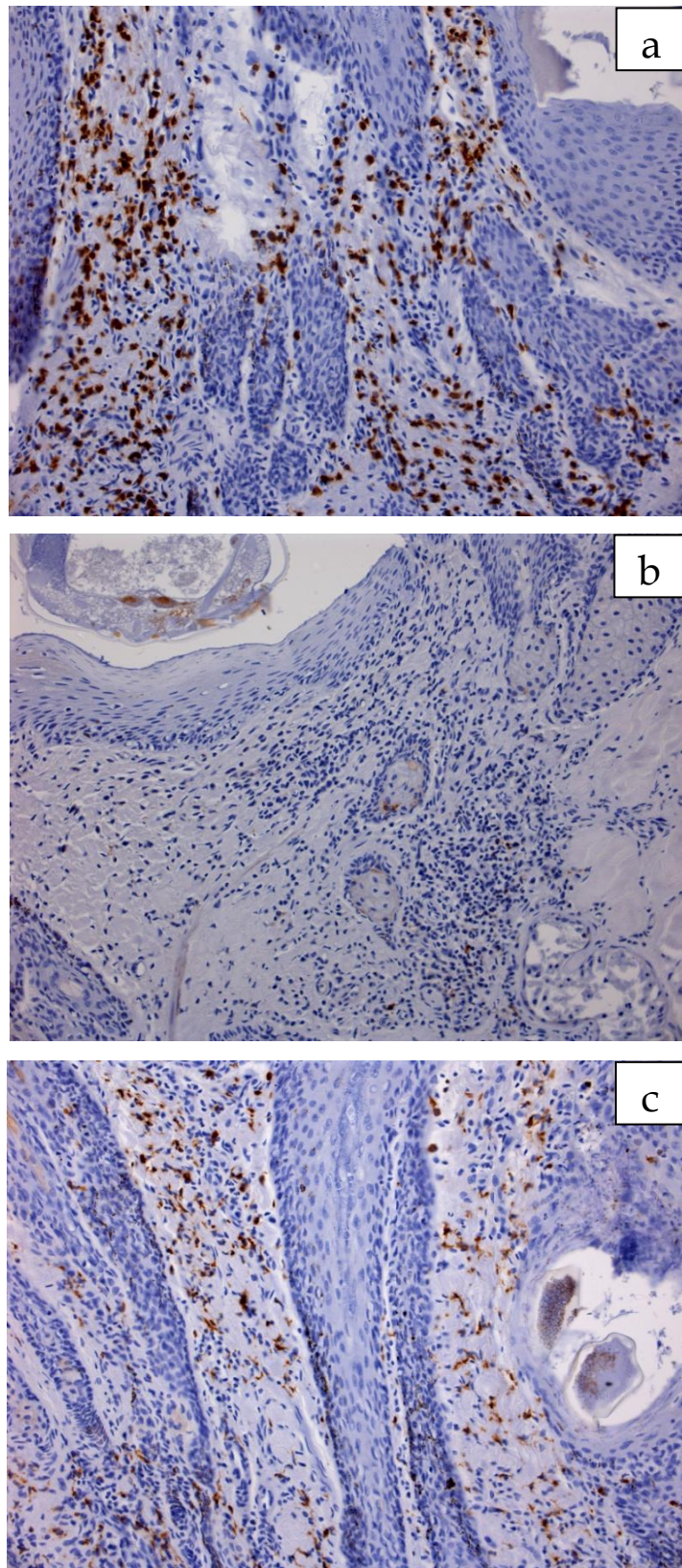


Figura 23 – Colorazione Immunoistochimica in sezione istologica di tessuto cutaneo di camosci affetti da rogna sarcoptica per identificazione di cellule CD3⁺ (a), CD79⁺(b) e CD68⁺ (c)

In Tabella 16 sono riportate la media e la deviazione standard del numero di linfociti CD3⁺, linfociti B CD79⁺ e macrofagi CD68⁺ calcolate nei tre gruppi di animali

- Camosci sani
- Camosci affetti da altra ectoparassitosi
- Camosci affetti da rogna

Tabella 16 – Media e deviazione standard delle popolazioni cellulari esaminate nei gruppi animali di studio

	CD3	CD79	CD68
Camosci sani	9,0 ±4,0	1,0±2,0	10,5± 2,7
Camosci affetti da altra ectoparassitosi	13,6±8,7	5,0±5,2	16,3±14,3
Camosci affetti da rogna sarcoptica	14,8±7,8	3,9±2,8	22,0± 9,8

Le medie sono state confrontate statisticamente con il seguente schema:

- Gruppi di animali parassitati (Rogna sarcoptica e altra parassitosi) e gruppi di animali sani.
- Gruppi di animali affetti da rogna sarcoptica e gruppi di animali affetti da altra parassitosi
- Nel gruppo di animali affetti da rogna sarcoptica è stata eseguita un'analisi secondo il grading del parametro croste, evidenziando le differenze presenti nelle popolazioni cellulari all'aumentare o al diminuire della gravità delle lesioni crostose.

8.3.1 Animali parassitati (Rogna sarcoptica e altra parassitosi) e animali sani.

Nella Figura 24 viene mostrata la distribuzione delle cellule CD3⁺/10.000µm nei campioni prelevati dai soggetti dei tre gruppi presi in esame.

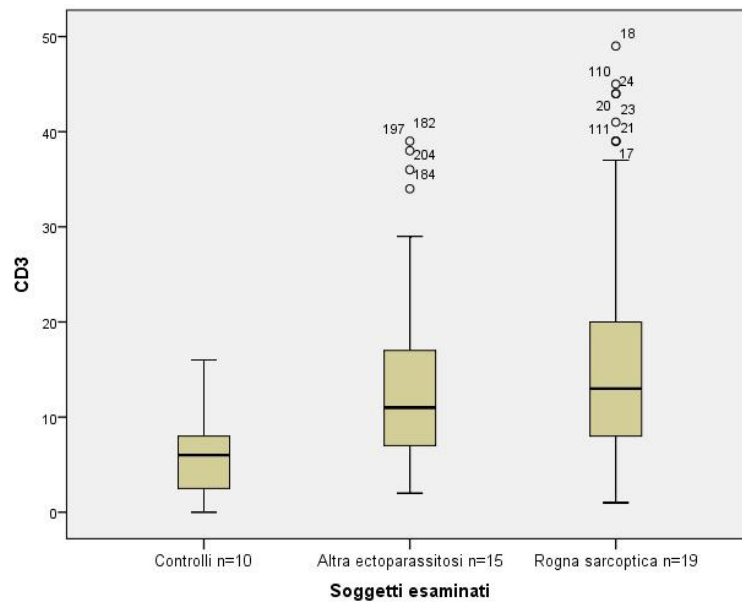


Figura 24 – Distribuzione delle cellule linfocitarie CD3⁺ tra i gruppi di animali esaminati

La Figura 24 dimostra come i due gruppi di animali affetti da parassitosi abbiano un numero più elevato di linfociti CD3⁺ rispetto agli animali sani di controllo ($p < 0,0001$).

Lo stesso risultato si ottiene per le popolazioni cellulari di Linfociti B CD79⁺ ($p < 0,001$) e macrofagi CD68⁺, rappresentate in Figura 25 e Figura 26

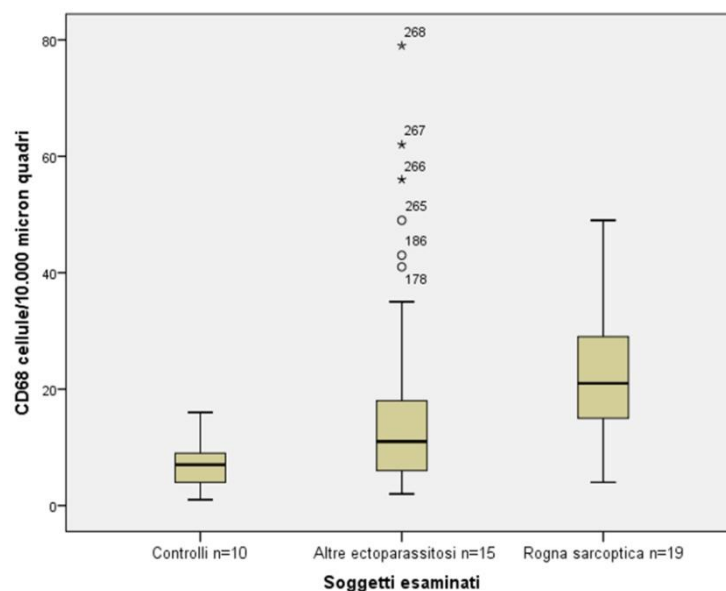


Figura 25 – Distribuzione delle cellule macrofagiche CD68⁺ tra i gruppi di animali esaminati

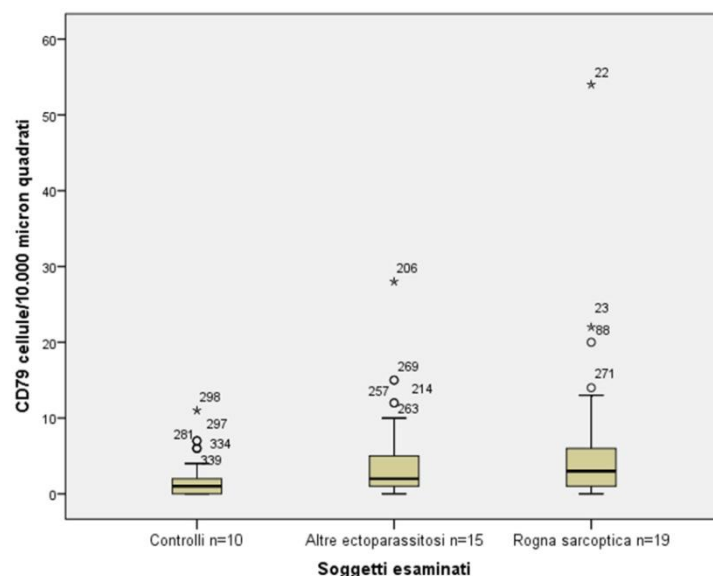


Figura 26 – Distribuzione delle cellule linfocitarie CD79⁺ tra i gruppi di animali esaminati

8.3.2 Animali affetti da rogna sarcoptica e soggetti con altra parassitosi

Dal confronto statistico delle medie delle popolazioni cellulari esaminate di camosci affetti da rogna sarcoptica rispetto a quelli affetti da altra parassitosi (vedi Tabella 16) si è ottenuto che:

- I linfociti CD3⁺ aumentano nei camosci affetti da rogna sarcoptica rispetto all'altro gruppo ($p=0,047$);
- Il linfociti B CD79⁺ diminuiscono nei soggetti affetti da rogna sarcoptica, ma la differenza non è statisticamente significativa;
- I macrofagi, sono più elevati nei soggetti affetti da rogna sarcoptica rispetto ai soggetti con altra ectoparassitosi, $p=0,005$.

8.3.3 Confronto per grading di crosta tra animali affetti da rogna sarcoptica e animali affetti da altra parassitosi

I valori medi di linfociti T, B e macrofagi di camosci con rogna sarcoptica sono stati confrontati con quelli dei camosci affetti da altra ectoparassitosi, tenendo conto della gravità delle lesioni valutata attraverso lo score per identificare la presenza di croste. In particolare il confronto è stato fatto tra la media di cellule CD3⁺, CD79⁺, CD68⁺ in soggetti affetti da rogna sarcoptica

suddivisi per score 1, score 2 e score 3 per il parametro crosta, e la media di cellule CD3⁺, CD79⁺, CD68⁺ in animali con altra ectoparassitosi di score 1 per il parametro crosta. I valori di p sono riportati in Tabella 17

Tabella 17- Camosci affetti da rogna sarcoptica e camosci affetti da altra ectoparassitosi con grading 1

			Camosci affetti da altra ectoparassitosi			
			Grading croste 1			
Camosci affetti da rogna sarcoptica			Popolazioni cellulari	CD3	<u>CD79</u>	<u>CD68</u>
	Grading Croste	1	CD3	No sign		
			CD79		p<0.001	
			CD68			No sign
		2	CD3	No sig		
			CD79		p<0.001	
			CD68			p<0.05
		3	<u>CD3</u>	p<0.05		
			CD79		No sig	
			CD68			No sign

La sottolineatura indica che la popolazione è quella significativamente maggiore.

I dati in Tabella 17 indicano una differenza significativa tra:

- **Linfociti T CD3⁺:** solo a livello di score 3 delle croste si ha un numero significativamente maggiore di linfociti T nei camosci affetti da rogna sarcoptica rispetto a quelli affetti da altra parassitosi
- **Linfociti B CD79⁺:** la media di linfociti B è significativamente maggiore in camosci affetti da altra ectoparassitosi in croste con score 1 rispetto alla media di linfociti B presenti in camosci affetti da rogna sarcoptica in

croste sia si grado 1 che 2; mentre non c'è differenza significativa tra la media di linfociti B croste score 1 camosci affetti da altra parassitosi e media linfociti B croste 3 camosci rognosi.

- **CD 68⁺** : la media dei macrofagi è significativamente maggiore in camosci affetti da altra ectoparassitosi in croste con score 1 rispetto alla media macrofagi presenti in camosci affetti da rogna sarcoptica in croste con score 2;

8.3.4 Confronto tra le popolazioni cellulari in camosci affetti da rogna sarcoptica suddivisi sulla base della gravità delle lesioni (score croste)

Nelle tabelle di seguito (Tabella 18) sono riportate le medie e relative deviazioni standard delle cellule immunitarie prese in esame, in rapporto a:

- gruppo di appartenenza degli animali (rogna sarcoptica, altri ectoparassiti e controlli negativi);
- livello di score delle croste

Tabella 18 - Confronto tra score crosta e numero di cellule positive per CD3, CD79 e CD68 nei tre gruppi di animali

Camosci affetti da rogna sarcoptica		Numero media Cellule esaminate		
		CD3	CD79	CD68
Grading rogna	1	14,6±8,9	3,5±3,3	22,9±7,8
	2	13,1±7,1	3,27±3,5	18,2±9,8
	3	15,1±7	5,7±7,3	23,1±9,9

Sono state confrontate le medie di linfociti CD3⁺, linfociti CD79⁺ e macrofagi CD68⁺ all'interno del gruppo di animali affetti da rogna sarcoptica valutandone le differenze al variare del gradig del parametro per quantificare la gravità delle lesioni crostose. Non sono presenti differenze statisticamente significative nel numero di linfociti CD3⁺ e CD79⁺, mentre è stata riscontrata una differenza significativa tra la quantità di macrofagi rilevati nei soggetti in grading 1 e quelli con grading 2 (p=0,036). Anche i soggetti con grading 3

rivelano una quantità di macrofagi maggiore rispetto a quelli con grading 2, ma la differenza non è risultata statisticamente significativa.

9 CONCLUSIONI FASE 2

Dai dati ottenuti nella Fase 2 del presente studio risulta che camosci affetti da rogna sarcoptica mostrano croste con lesioni di gravità superiore rispetto a quella osservate in camosci affetti dall' altra ectoparassitosi. Ugualmente il quadro relativo alla gravità delle aree di alopecia ed al numero di acari, riscontrato nei camosci con rogna sarcoptica è significativamente più elevato rispetto a quello dei camosci dell'altro gruppo: prevalgono infatti aree di alopecia con score 3 ed un numero più elevato di acari. Questo dato è supportato dalle caratteristiche biologiche di *Sarcoptes scabiei* che a differenza dei altri acari scava gallerie nello strato epidermico, determinando una maggiore gravità del quadro patologico riscontrato a livello cutaneo.

Per quanto riguarda le cellule che compongono gli infiltrati infiammatori nei soggetti parassitati si è osservata la presenza di eosinofilia, più marcata in associazione con l'infezione da *Sarcoptes*.

La numerosità di linfociti osservata nell'epidermide dei tre gruppi di camosci studiati è risultata più elevata nei soggetti con le due parassitosi, mentre non sono state evidenziate differenze significative tra i camosci con rogna sarcoptica e quelli con l'altra parassitosi.

Vista la presenza di una ricca popolazione linfocitaria anche nei soggetti apparentemente sani, si ritiene necessario lo svolgimento di ulteriori approfondimenti finalizzati a valutare la specificità funzionale dei linfociti osservati a livello cutaneo in questi soggetti. In particolare a quale popolazione cellulare linfocitaria possano appartenere, considerando che l'identificazione di linfociti T e B non ha chiarito il problema. Queste cellule, oltre ad essere dei T immaturi potrebbero essere Natural-killer e nell'ambito dei linfociti T particolare interesse destano i linfociti T-reg Foxp3⁺.

La componente mastocitaria è risultata essere scarsamente rappresentata nei camosci sani; infatti, soltanto in 1 camoscio su 30 di quelli studiati è stato riscontrato un numero di mastociti riconducibile a score 1. Anche la presenza di

parassitosi non sembra influenzare la presenza di queste cellule per altro legata a patologie immuno-mediate.

I dati del presente studio confermano la presenza di eosinofilia descritta negli infiltrati tissutali di camosci (*Rupicapra pyrenaica parva*), caprioli, lupi, volpi (Oleaga et al, 2012) e uomo (Arlian, Rapp et al. 1994) colpiti da rogna.

La presenza di eosinofilia è segnalata nelle dermatiti locali o sistemiche associate a ectoparassiti. Dati di letteratura riportano che animali infestati da acari presentano una combinazione di reazioni di ipersensibilità di tipo I e di tipo IV (ovvero ritardata), quindi la presenza di eosinofili potrebbe essere legata ad una risposta di tipo I (Bornestein et al., 2001; Pence & Ueckermann, 2002), segnalata in volpi colpite da rogna sarcoptica variante *canis* (Arlian et al, 1994).

Le indagini condotte per effettuare la caratterizzazione fenotipica delle cellule immunitarie presenti negli infiltrati infiammatori ha permesso di rilevare come linfociti T CD3⁺, linfociti B CD79⁺ e macrofagi CD68⁺ siano presenti in tutti gli animali colpiti da rogna e dall'altra ectoparassitosi, in quantità significativamente superiore a quella dei camosci sani.

Una percentuale maggiore di linfociti T è risultata essere presente nelle cuti dei camosci con rogna sarcoptica e con l'altra parassitosi e questa differenza è risultata essere statisticamente significativa. I camosci con rogna sarcoptica hanno presentato inoltre una quantità maggiore di linfociti CD3⁺ rispetto ai soggetti con l'altra parassitosi.

Anche i linfociti B sono risultati essere presenti in quantità maggiore nei soggetti parassitati rispetto ai controlli sani e i camosci con la rogna sarcoptica hanno presentato una quantità di B inferiore rispetto ai soggetti con l'altra parassitosi.

Anche per i macrofagi CD68⁺ i camosci parassitati hanno presentato una quantità di cellule macrofagiche superiore rispetto ai soggetti sani e quelli con rogna sarcoptica superiore a quelli con l'altra parassitosi.

In conclusione, l'insieme delle osservazioni condotte ci consente di affermare come l'impiego delle diverse metodiche finalizzate a determinare la gravità delle lesioni, l'uso degli anticorpi utilizzati e delle tecniche di immunoistochimica messe a punto siano risultati in grado di caratterizzare nel dettaglio le modificazioni indotte dai parassiti e le sottopolazioni linfocitarie e macrofagiche presenti nella cute dei camosci indagati.

Per quanto riguarda il grading delle lesioni riscontrate nei soggetti parassitati le nostre indagini hanno confermato la presenza di un eosinofilia e linfocitosi nelle aree colpite dai parassiti, più grave nei soggetti con rogna sarcoptica.

Nei soggetti parassitati è stato possibile identificare cellule immunitarie caratteristiche sia di una risposta cellule mediata (Th1) che umorale (Th2). In particolare, vista la presenza nei soggetti con rogna sarcoptica di un maggior numero di linfociti CD3⁺ e un numero più basso di linfociti B sembra di poter affermare che a questa infezione si associ una risposta prevalentemente di tipo cellulo-mediato (Th1).

Per verificare questa ipotesi sono necessari ulteriori studi in cui si indaghino le sottopolazione dei linfociti T CD4, CD8 ed eventuali linfociti T Reg.

Per quanto a nostra conoscenza, comunque questo è il primo studio su camosci affetti da rogna sarcoptica in cui sia stata eseguita una immunofenotipizzazione in situ delle popolazioni cellulari del sistema immunitario.

10 BIBLIOGRAFIA

Arlian, L. G., D. L. Vyszenski-Moher, and A. M. Gilmore. 1988. Cross-antigenicity between *Sarcoptes scabiei* and the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *J. Med. Entomol.* 25:240-247.

Arlian, L. G. 1989. Biology, host relations, and epidemiology of *Sarcoptes scabiei*. *Ann. Rev. Entomol.* 34:139-161.

Arlian, L.G., R.A. Runyan, and D.L. Vyszenski-Moher. 1988b. Water balance and nutrient procurement of *Sarcoptes scabiei* var. *canis* (Acari: Sarcoptidae). *Journal of Medical Entomology* 25:64-68.

Arlian, L. G., D. L. Vyszenski-Moher, S. G. Ahmed, and S. A. Estes. 1991. Crossantigenicity between the scabies mite, *Sarcoptes scabiei* and the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J. Invest. Dermatol.* 96:349-354.

Arlian, L. G., C. M. Rapp, D. L. Vyszenski-Moher, and M. S. Morgan. 1994. *Sarcoptes scabiei*: histopathological changes associated with acquisition and expression of host immunity to scabies. *Experimental Parasitology* 78:51-63.

Arlian, L. G., C. M. Rapp, and M. S. Morgan. 1995. Resistance and immune response in scabies-infested hosts immunized with *Dermatophagoides* mites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52:539-545.

Arlian, L. G., M. S. Morgan, C. M. Rapp, and D. L. Vyszenski-Moher. 1996. The development of protective immunity in canine scabies. *Veterinary Parasitology* 62:133-142.

Arlian, L. G., and M. S. Morgan. 2000. Serum antibody to *Sarcoptes scabiei* and house dust mite prior to and during infestation with *Sarcoptes scabiei*. *Veterinary Parasitology* 90:315-326

Beckstead, J.H., 1994. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1127-1134.

Bornstein S., Torsten Mörner, and William M. Samuel - *Sarcoptes scabiei* and sarcoptic mange

Cantón, G.J., Konrad, J.L., Moore, D.P., Caspe, S.G., Palarea-Albaladejo, J., Campero, C.M., Chianini, F., 2014. Characterization of immune cell infiltration in the placentome of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) infected with *Neospora caninum* during pregnancy. *J. Comp. Pathol.* 150, 463-468.

Casaubon, J., Chaignat, V., Vogt, H.R., Michel, A.O., Thür, B., Ryser-Degiorgis, M.P., 2013. Survey of bluetongue virus infection in free-ranging wild ruminants in Switzerland. *BMC Vet. Res.* 14, 166.

Casaubon, J., Vogt, H.R., Stalder, H., Hug, C., Ryser-Degiorgis, M.P., 2012. Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Vet. Res.* 29, 204.

Carnevali L, Pedrotti L., Rinda F., Toso S., Banca dati ungulati – Status distribuzione, consistenza, gestione e prelievo venatorio delle popolazioni di Ungulati in Italia, Rapport/Report 2001-2005

Cesta, M.F., 2006. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* 34, 455-465.

Chianini, F., Majó, N., Segalés, J., Domínguez, J., Domingo, M., 2001. Immunohistological study of the immune system cells in paraffin-embedded tissues of conventional pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82, 245-255.

Chianini, F., Sisó, S., Ricci, E., Eaton, S.L., Finlayson, J., Pang, Y., Hamilton, S., Steele, P., Reid, H.W., Cantile, C., Sales, J., Jeffrey, M., Dagleish, M.P., González, L., 2013. Pathogenesis of scrapie in ARQ/ARQ sheep after subcutaneous infection: effect of lymphadenectomy and immune cell subset changes in relation to prion protein accumulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 348-358.

Chiari, M., Sozzi, E., Zanoni, M., Alborali, L.G., Lavazza, A., Cordioli, P., 2014. Serosurvey for schmallenberg virus in alpine wild ungulates. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 1-3.

Citterio, C.V., Caslini, C., Milani, F., Sala, M., Ferrari, N., Lanfranchi, P., 2006. Abomasal nematode community in an alpine chamois (*Rupicapra r.rupicapra*) population before and after a die-off. *J. Parasitol.* 92, 918-927

Couturier MAJ (1938) Le chamois. B. Arthaud-Editeur, Grenoble. 855 pp.

Crestanello B (2002/2004) Variabilità genetica, divergenza e traslocazione nel camoscio (*Rupicapra ssp.*): implicazioni per la tassonomia e la gestione. Dottorato di ricerca in biologia, Università degli studi di Ferrara. pp. 120

Dagleish, M.P., Finlayson, J., Steele, P.J., Pang, Y., Hamilton, S., Eaton, S.L., Sales, J., González, L., Chianini, F., 2012. Immunophenotype of cells within cervine rectoanal mucosa-associated lymphoid tissue and mesenteric lymph nodes. *J. Comp. Path.* 146, 365-371.

De Meneghi, D., Ferroglio, E., Bollo, E., Vizcaino, L.L., Moresco, A., Rossi, L., 2002. Dermatophilosis of Alpine Chamois (*Rupicapra rupicapra*) in Italy. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 144, 131-136.

Dolan JM (1963) Beitrag zur systematischen Gliederung des Tribus Kupicupini Simpson 1945. *Zeitschrift fur zoologische Systematik und Evolutionsforschung.* 1: 311-407

Erard H., G. Carmignola, P. Stefani, L. Gerstgrass 2006 - Rapporto rogna sarcoptica 2006 - Ufficio caccia e pesca

Fain A. (1968) - Etude de la variabilità de *Sarcoptes scabiei* avec une revision des *Sarcoptidae*. *Acta zool. Pathol. Antverp.*, 47, 1-196

Falk, E. S., and T. J. Eide. 1981. Histologic and clinical findings in human scabies. *Int. J. Dermatol.* 20:600-605.

Falk, E. S., and R. Matre. 1982. In situ characterization of cell infiltrates in the dermis of human scabies. *The American Journal of Dermatopathology* 4:9-15.

Forstner, M. J. 1962. Die technik und der verlauf der kunstlichen ansteckung sowie beobachtungen bei der natuerlichen infektion von gamswild mit raudemilben (*Sarcoptes rupicaprae*). *Zeitschrift fur Jagdwissenschaft* 8:148-158.

Galeotti, M., Sarli, G., Eleni, C., Marcato, P.S., 1993. Identification of cell types present in bovine haemolymph nodes and lymph nodes by immunostaining. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 36, 319-331.

Gonzalez L., I. Anderson, D. Deane, C. Summers and D. Buxton, 2001 - Detection of Immune System Cells in Paraffin Wax-embedded Ovine Tissues

Heilesen, B. 1946. Studies on *Acarus scabiei* and scabies. *Acta Dermatovenerologica* 26:1-370.

Herder, V., Hansmann, F., Wohlsein, P., Peters, M., Varela, M., Palmarini, M., Baumgärtner, W., 2013. Immunophenotyping of inflammatory cells associated with Schmallenberg virus infection of the central nervous system of ruminants. *PLoS One* 8, e62939.

Hoby, S., Mathis. A., Doherr, M.G., Robert, N., Ryser-Degiorgis, M.P., 2009. *Babesia capreoli* infections in alpine chamois (*Rupicapra r. Rupicapra*), roe deer (*Capreolus c. Capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Switzerland. *J. Wildl. Dis.* 45, 748-753.

Holzwarth, N., Pospischil, A., Mavrot, F., Vilei, E.M., Hilbe, M., Zlinszky, K., Regenscheit, N., Pewsner, M., Thoma, R., Borel, N., 2011. Occurrence of Chlamydiaceae, *Mycoplasma conjunctivae*, and pestiviruses in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) of Grisons, Switzerland. 23, 333-337

Ingrosso Sofia, 2008-2009. Variabilità genetica di MHC di classe II locus *DRB* in popolazioni selvatiche di camoscio alpino (*Rupicapra r. rupicapra*) e camoscio pirenaico (*Rupicapra p. pyrenaica*)

Lalli Peter N., Marjorie S. Morgan, and Larry G. Arlian*, 2004 - Skewed th1/th2 immune response to sarcoptes scabiei

Little, S. E., W. R. Davidson, E. W. Howerth, P. M. Rakich, and V. F. Nettles. 1998a. Diseases diagnosed in red foxes from Southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases* 34:620-624.

Liebich H-G. - Istologia e anatomia microscopica dei mammiferi domestici e degli uccelli, Edizione italiana a cura di C.Balarin, G.Randelli. 2012, Piccin, cap. 8 pag. 164-170

Lovari S & Scala C (1980) Revision of *Rupicapra* Genus. I. A statistical reevaluation of Couturier's data on the morphometry of six chamois subspecies. *Boll Zool* 47:113-124

Lovari S (1985) Behavioural repertoire of the Abruzzo Chamois (*Rupicapra pyrenaica ornata*). *Saugetierkundliche Mitteilungen* 32:113-136

Lovari S (1987) Evolutionary aspects of the biology of chamois, *Rupicapra* spp. (Bovidae, Caprinae). In: *The biology and management of Capricornis and related mountain antelopes*. Soma H. (ed). Croom-Helm: London. pp 51-61

Lydekker R (1913) Artiodactyla, family Bovidae, subfamilies Bovinae to Ovibovinae (cattle, sheep, goats, chamois, serows, takin, musk-oxen, etc.). In: *Catalogue of the ungulate mammals in the British Museum (Natural History)*. Trustees of the British Museum (Nat. Hist.), London. Vol. I. 249 pp.

Masini F & Lovari S (1988) Systematics, Phylogenetic Relationships and dispersal of the Chamois (*Rupicapra* spp.). *Quaternary Research* 30:339-349

Mavrot, F., Vilei, E.M., Marreros, N., Signer, C., Frey, J., Ryser-Degiorgis, M.P., 2012. Occurrence, quantification, and genotyping of *Mycoplasma conjunctivae* in wild Caprinae with and without infectious keratoconjunctivitis. *J. Wildl. Dis.* 48, 619-631.

Mengual-Chuliá, B., Domenis, L., Robetto, S., Bravo, I.G., 2014. A novel papillomavirus isolated from a nasal neoplasia in an Italian free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Vet. Microbiol.* 6, 108-119.

Mick, V., Le Carrou, G., Corde, Y., Game, Y., Jay, M., Garin-Bastuji, B., 2014. *Brucella melitensis* in France: persistence in wildlife and probable spillover from Alpine ibex to domestic animals. *PLoS One*. 14, e94168.

Menzano A. - La risposta immunitaria in corso di rogna sarcoptica nel camoscio (*rupicapra rupicapra*)

Menzano A, Rambozzi L., Rossi L., 2014 – Outbreak of scabies in human beings acquired from chamois (*Rupicapra rupicaprae*)

Mellanby, K. 1944. The development of symptoms, parasitic infection and immunity in human scabies. *Parasitology* 35:197-206.

— — — . 1972. *Scabies*, 2d ed. Middlesex, UK: E.W. Classey Ltd.

— — — . 1977. Biology of the parasite. In *Scabies and pediculosis*. Ed. M. Orkin, H.I. Maibach, L.C. Parish, and R.M. Schwartzman. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Co., pp. 8-16.

Morita, T., S. Kaneko, A. Shibata, S. Imai, Y. Kaneko, T. Kanda, and E. Kanda. 1998. Antibody against *Sarcoptes scabiei* in wild racoon dogs with severe scabies. Poster Session. *Parasitology International* 47 (Suppl.):326

Morsy, G. H., and S. M. Gaafar. 1989. Responses of immunoglobulin-secreting cells in the skin of pigs during *Sarcoptes scabiei* infestation. *Veterinary Parasitology* 33:165-175.

Mustoni, A., Pedrotti, L., Zanon, E., Tosi, G., 2002. Ungulati delle Alpi - Nitida Immagine Editrice, Cles (TN).

Navarro J.A., Caro M.R., Seva J., Rosillo M.C., Gomez M.A., Gallego M.C., 1996 – Study of lymphocyte subpopulation in peripheral blood and secondary

lymphoid organz in the goat using monoclonal antibodies to surface markers of bovine lymphocytes

Nascetti G, Lovari S, Lanfranchi P, Berducou C, Mattiucci S, Rossi L, Bullini L (1985) Revision of *Rupicapra* genus III: electrophoretic studies demonstrating species 118 distinction of chamois populations of the Alps from those of the Apennines and Pyrenees. In: Lovari S (ed) *Biology and management of mountain ungulates. Croom-Helm*, London, pp 57-62

Nimmervoll Helena,¹ Stefan Hoby, Nadia Robert, Elena Lommano, Monika Welle, and Marie-Pierre Ryser- Degiorgis, 2013 - Pathology of sarcoptic mange in red foxes (*vulpes vulpes*): macroscopic and histologic characterization of three disease stages

Nocture, M., Cabaret, J., Hugonnet-Chapelle, L., 1998. Protostrongylid nematode infection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) at the Bauges massif (French Alps). *Vet. Parasitol.* 77, 153-161.

Oleaga A., Casais R., Prieto J.M., Gortazar C., Balseiro A., 2012 - Comparative pathological and immunohistochemical features of sarcoptic mange in five sympatric wildlife species in Northern Spain.

Onderscheka, K., T. Steineck, and F. Tataruch. 1989. Der klinische verlauf der gamsraude. Tagungsbericht CIC-Gamswildsymposium. Ljublyana (S. Linn, ed.), GWI Duick, Munchen:331-349.

Pence D.D., Casto S.D. & Samuel W.M. (1975) - Variation in the chaetotaxy and dendiculation of *Sarcoptes scabiei* (Acarina: Sarcoptidae) from wild canids. *Acarologia*, 17, 160-165

Pence, D. B., and E. Ueckermann. 2002. Sarcoptic mange in wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 21:385-398.

- Pérez T**, Albornoz J, Dominguez A (2002) Phylogeography of chamois (*Rupicapra* spp.) inferred from microsatellites. *Mol Phylogenet Evol* 25:524-34
- Pioz, M.**, Loison, A., Gauthier, D., Gibert, P., Julienne, J., Artois, M., Gilot-Fromont, E., 2008. Diseases and reproductive success in a wild mammal: example in the alpine chamois. *Oecologia* 155, 691-704.
- Posautz, A.**, Loncaric, I., Kübber-Heiss, A., Knoll, A., Walzer, C. Acute die-off of chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the eastern Austrian Alps due to bacterial bronchopneumonia with *Pasteurellaceae*. *J. Wildl. Dis.* 50, 616-620
- Ramos-Vara, J.A.** Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelak, B., Czub, S., Del Piero, F., Dial, S., Ehrhart, E. J., Graham, T., Manning, L., Paulsen, D., Valli, V.E., West, K., 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 393-413.
- Rantanen, T.**, F. Bjorksten, T. Reunala, and O. P. Salo. 1981. Serum IgE antibodies to scabies mite. *Acta Dermatovener* 61:358-360.
- Rode, B.**, Bavdek, S.V., Lackovic, G., Fazarinc, G., Bidovec, A., 1998. Immunohistochemical study of normal and mange (*S. scabiei* var. *rupicaprae*) infected chamois (*Rupicapra rupicapra* L.) skin. *Anat. Histol. Embryol.* 27, 187-192.
- Rossi, L.**, P. G. Meneguz, P. De Martin, and M. Rodolfi. 1995. The epizootiology of sarcoptic mange in chamois, *Rupicapra rupicapra*, from the Italian eastern alps. *Parassitologia* 37:233-240.
- Sheahan, B. J.** 1975. Pathology of *Sarcoptes scabiei* infection in pigs. Naturally occurring and experimentally induced lesions. *J. Comp. Path.* 85:87-95.

Skerratt, L. F., D. Middleton, and I. Beveridge. 1999. Distribution of life cycle stages of *Sarcoptic scabiei* var. *wombati* and effects of severe mange on common wombats in Victoria. *Journal of Wildlife Diseases* 35:633-646.

Spagnesi M., De Marinis A.M.- Mammiferi d'Italia, Quaderni di conservazione della Natura

Stancampiano, L., Guberti, V., 2006. Models of parasite biocoenosis dynamic: host density and gastrointestinal parasites in alpine chamois. *Parassitologia*, 48, 47-49.

Stemmer B. L., M. S. Morgan, and P. F. Moore. 1997. Characterization of lymphocyte subtypes in scabietic skin lesions of naïve and sensitized dogs. *Veterinary Parasitology* 68: 347-358.

Stemmer B. L., Ll. G. Arlian, M. S. Morgan, C. M. Rapp, and P. F. Moore. 1996. Characterization of antigen presenting cells and Tcells in progressing scabietic skin lesions. *Veterinary Parasitology* 67: 247-258.

Tizard, I. 1992. Immunity to parasites. *Veterinary immunology - an introduction*. IV edition. Ed. Saunders:303-317.

Thiel, J.L., Kimmig, L., Salzer, U., Grudzien, M., Lebrecht, D., Hagena, T., Draeger, R., Voelxen, N., Bergbreiter, A., Jennings, S., Gutenberger, S., Aichem, A., Illges, H., Hannan, J.P., Kienzler, A.K., Rizzi, M., Eibel, H., Peter, H.H., Warnatz, K., Grimbacher, B., Rump, J.A., Schlesier, M., 2012. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 801-810.

Thomson, J., T. Cochrane, and R. Cochran. 1974. Histology simulating reticulosis in persistent nodular scabies. *British Journal of Dermatology* 90:421.

Tingstedt, J., Tornehave, D., Lind, P., Nielsen, J., 2003. Immunohistochemical detection of SWC3, CD2, CD3, CD4 and CD8 antigens in paraformaldehyde

fixed and paraffin embedded porcine lymphoid tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94, 123-132.

Van Neste, D.J. 1986. Immunology of scabies. *Parasitology Today* 2:194-196.
1988. Human scabies in perspective. *International Journal of Dermatology* 27:10-15.

Walker A. R. (1994) – Arthropods of humans and domestic animals: a guide to preliminary identification. London, Chapman E. Hall

Willard-Mack, C.L., 2006. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol. Pathol.* 34, 409-424.

Yager, J. A., and D. W. Scott. 1985. The skin and appendages. In: *Pathology of domestic animals*, 4th Ed. (K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy & N. Palmer, eds), Vol. 1. Academic Press, St Louis:408-549.

Zaffaroni, E., Teresa Manfredi, M., Citterio, C., Sala, M., Piccolo, G., Lanfranchi, P., 2000. Host specificity of abomasal nematodes in free ranging alpine ruminants. *Vet. Parasitol.* 90, 221-230.

11 – RINGRAZIAMENTI

*Desidero innanzitutto ringraziare il Professor Alessandro Poli per i preziosi insegnamenti durante l'ultimo anno di laurea magistrale e per le numerose ore dedicate alla mia tesi. Inoltre, ringrazio sentitamente la Dott.ssa Claudia Salvadori che è sempre stata disponibile a dirimere i miei dubbi durante la stesura di questo lavoro. Intendo poi ringraziare per la particolare disponibilità la Dott.ssa Francesca Chianini del Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan Penicuik (Scotland UK) per il contributo all'analisi statistica dei dati relativi alla stesura dei protocolli di immunoistochimica nei tessuti linfoidei. Inoltre, vorrei esprimere la mia sincera gratitudine al Tecnico di laboratorio biomedico Davide Lorenzi che mi ha guidato nell'apprendimento di alcune delle tecniche di laboratorio da me utilizzate nell'ambito di questa tesi. Infine un ringraziamento alla Dott.ssa Arianna Menzano che mi ha permesso di accedere al suo elaborato di dottorato di ricerca "La risposta immunitaria in corso di rogna sarcoptica nel camoscio (*Rupicapra rupicaprae*)".*